

**Charakterisierung von *gpsB*-Suppressorgenen in
*Listeria monocytogenes***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sabrina Wamp
aus Hameln

1. Referentin:

Professorin Dr. Susanne Engelmann

2. Referent:

PD Dr. Sven Halbedel

eingereicht am:

18.06.2020

mündliche Prüfung (Disputation) am:

15.12.2020

Druckjahr 2021

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Wamp S, Rutter ZJ, Rismondo J, Jennings CE, Möller L, Lewis RJ, Halbedel S. PrkA controls peptidoglycan biosynthesis through the essential phosphorylation of ReoM. (2020). *eLife* 9:e56048. doi: 10.7554/eLife.56048.

Tagungsbeiträge

Wamp S, Rismondo J, Gründling A, Möller L, Halbedel S. Identification and characterization of a novel cell division protein in *Listeria monocytogenes*. (Talk). Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Mainz (2019).

Posterbeiträge

Wamp S, Rismondo J, Gründling A, Möller L, Halbedel S. Identification of a novel cell division protein in *Listeria monocytogenes*. (ePoster). Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Wolfsburg (2018).

Wamp S, Rismondo J, Gründling A, Möller L, Halbedel S. Identification of a novel cell division protein in *Listeria monocytogenes*. (Poster). Zellbiologie-Symposium der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Rauschholzhausen (2018).

Wamp S, Rismondo J, Gründling A, Möller L, Halbedel S. Identification of a novel cell division protein in *Listeria monocytogenes*. (Poster). *BACELL* 2019. Ljubljana, Slowenien (2019).

Wamp S, Rutter ZJ, Rismondo J, Lewis RJ, Halbedel S. Novel *gpsB* suppressor genes provide a functional link between the serine/threonine kinase PrkA and control of cell wall biosynthesis. (Poster). International Symposium on Problems of Listeria and Listeriosis (ISOPOL). Toronto, Kanada (2019).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Zusammenfassung.....	VII
Summary.....	VIII
1. Einleitung	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2 Infektionszyklus, Symptomatik und Behandlung der Listeriose	2
1.3 Zellwachstum, Zellteilung und Regulationsmechanismen	5
1.3.1 Peptidoglykanbiosynthese	5
1.3.2 Zellwachstum und Zellteilung	9
1.3.3 Regulation bakterieller Lebensvorgänge durch ClpCP-abhängigen Proteinabbau	12
1.3.4 Regulation bakterieller Lebensvorgänge durch Serin/Threonin-Proteinkinasen	15
1.3.5 Die Rolle von GpsB in der Peptidoglykanbiosynthese und der Zellteilung	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	22
2.2 Kultivierungsbedingungen.....	28
2.2.1 Nährmedien und Medienzusätze	28
2.2.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	28
2.2.3 Kultivierung von <i>L. monocytogenes</i>	29
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA	29
2.3.2 Isolation chromosomaler DNA von <i>L. monocytogenes</i> und <i>B. subtilis</i>	29
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	30
2.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	31
2.3.5 Restriktionsverdau	31
2.3.6 Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.3.8.1 Primer-Design	32

2.3.8.2 Standard-Protokoll der Polymerase-Ketten-Reaktion	35
2.3.8.3 Site-directed mutagenesis.....	36
2.3.8.4 Restriktionsfreie Klonierung	36
2.3.8.5 Sequenzierung von DNA.....	37
2.3.9 Genomsequenzierung	38
2.3.10 DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone	38
2.3.10.1 Transformation von <i>E. coli</i>	38
2.3.10.2 Transformation von <i>L. monocytogenes</i>	39
2.3.10.3 Deletion von <i>L. monocytogenes</i> -Genen	40
2.4 Proteinbiochemische Methoden	40
2.4.1 Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	40
2.4.2 Isolation zellulärer Proteine von <i>L. monocytogenes</i> und <i>B. subtilis</i>	42
2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	42
2.4.4 Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970).....	42
2.4.5 Kolloidale Coomassie-Färbung.....	43
2.4.6 Western Blot.....	44
2.4.7 Nachweis von Proteinen durch Immundetektion	44
2.5 "Bacterial Adenylate Cyclase-based Two-Hybrid" (BACTH)-System	45
2.6 Phänotypische Charakterisierung	46
2.6.1 Wachstumskurven	46
2.6.2 Agardiffusionstest und MHK-Bestimmung	47
2.6.3 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	47
2.6.4 Probenvorbereitung zur Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie.....	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Identifikation und Charakterisierung von <i>gpsB</i> -Suppressormutationen.....	49
3.1.1 Wachstumsverhalten der <i>gpsB</i> -Suppressorstämme	49
3.1.2 Morphologie der <i>gpsB</i> -Suppressorstämme.....	51
3.1.3 MurA-Akkumulation in den <i>gpsB</i> -Suppressorstämmen	53
3.2 Charakterisierung der <i>gpsB</i> -Suppressorgene <i>reoM</i> (<i>Imo1503</i>) und <i>reoY</i> (<i>Imo1921</i>)	55
3.2.1 ClpCP-abhängige Akkumulation von MurA in den Δ <i>reoM</i> - und Δ <i>reoY</i> -Mutanten	55
3.2.2 MurAA-Akkumulation in <i>B. subtilis</i>	57
3.2.3 Einfluss der MurA-Akkumulation auf die Peptidoglykanbiosynthese	58

3.2.4 Überexpression und Reinigung von ReoM-Strep	61
3.2.5 Die Kristallstruktur von ReoM	62
3.2.6 Die Phosphorylierung von ReoM ist essenziell	64
3.2.7 Suppression der Letalität der <i>reoM T7A</i> -Mutante.....	67
3.2.8 Effekt von PrkA und PrpC auf die MurA-Stabilität	69
3.2.9 Der Einfluss der Deletion von <i>reoM</i> , <i>reoY</i> und <i>clpC</i> auf die <i>prkA</i> -Essenzialität	70
3.2.10 Identifizierung weiterer <i>gpsB</i> -Suppressormutationen in <i>murA</i> und <i>prpC</i>	72
3.2.11 <i>In vivo</i> Protein-Protein-Interaktionen von ReoM, ReoY, MurA, ClpC und ClpP	74
3.3 Charakterisierung des <i>gpsB</i> -Suppressorgens <i>lmo1549</i>	76
3.3.1 Komplementation des Zelllängenphänotyps der Δ <i>gpsB</i> Δ <i>lmo1549</i> -Mutante	76
3.3.2 Die Deletion von <i>lmo1549</i> im Vergleich mit bekannten Mechanismen der Suppression des Δ <i>gpsB</i> -Phänotyps	77
3.3.3 Konservierte Lokalisation von <i>lmo1549</i> (<i>radC</i>) upstream von <i>mreB</i> (<i>lmo1548</i>)	79
3.3.4 Screening nach einer genetischen Interaktion von Lmo1549 mit anderen Zellteilungsproteinen	80
3.3.5 Interaktion von Lmo1549 mit den Proteinen des Min-Systems.....	83
3.3.6 Interaktion von GpsB mit den Komponenten des Min-Systems.....	86
3.3.7 Untersuchung des Effekts der Deletionen von <i>lmo1549</i> und <i>gpsB</i> auf FtsZ.....	89
4. Diskussion	92
4.1 Die Rolle von ReoM und ReoY in der ClpCP-vermittelten Regulation der Zellwandhomöostase	92
4.1.1 ReoM und ReoY als potenzielle ClpC-Adaptoren	96
4.1.2 ReoM und ReoY als mögliche Faktoren in der Arginin-Phosphorylierung	98
4.1.3 ReoM, ReoY und MurZ beeinflussen die Cephalosporin-Resistenz in <i>L. monocytogenes</i>	101
4.2 Die Funktion von Lmo1549 in der Zellteilung von <i>L. monocytogenes</i>	104
5. Referenzen.....	109
6. Anhang.....	125

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
A	Adenin
A ₅₉₅	Absorption bei 595 nm
ad.	auffüllen auf
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATPase	Adenosintriphosphatase
B2H	Bacterial-Two-Hybrid
BHI	Brain Heart Infusion
bla	β-Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
c-di-AMP	zyklisches di-Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxyterminus
dd	doppelt destilliert
CTD	zytoplasmatische Domäne
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DUF	domain of unknown function
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
erm	Erythromycin
eSTPK	eukaryotic-like serine/threonine protein kinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fw	forward
G	Guanosin
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMW	High-molecular-weight
HRP	Horseradish peroxidase
i	IPTG-induzierbar
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
JAMM	Jab1/MPN/Mov34-Metalloenzym
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani
LBD	Lipidbindedomäne
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LLO	Listeriolysin

LMW	Low-molecular-weight
kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
M	molar
<i>meso</i> -Dap	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
mm	Millimeter
mM	millimolar
min	Minute
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
MS	Massenspektrometrie (mass spectrometry)
msfGFP	monomeric super folder GFP
MW	Molekulargewicht
N-Terminus	Aminoterminus
neo	Neomycin
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PASTA	PBP and serine/threonine kinase-associated
PBP	Penicillin-bindende Proteine
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>P_{help}</i>	IPTG-induzierbarer Promotor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGWB	Sucrose-Glycerol-Waschpuffer
<i>shg</i>	suppression of heat sensitive growth
SOE-PCR	splicing by overlap extension PCR
T	Thymin
t	Zeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	Tris-EDTA-SDS
TG	Transglykosylase
TP	Transpeptidase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
UDP	Uridindiphosphat

UP	Undecaprenylphosphat
UPP	Undecaprenyldiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
x g	relative Zentrifugalkraft
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
μ m	Mikrometer
λ	Wellenlänge
Ω	Ohm

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Zusammenfassung

Das späte Zellteilungsprotein GpsB hat eine wichtige Funktion in der Zellwandbiosynthese in Gram-positiven Bakterien. In dem Humanpathogen *Listeria monocytogenes* interagiert GpsB mit dem Klasse A Penicillin-bindenden Protein PBP A1, welches an der Polymerisierung des Peptidoglykans im letzten Schritt der Zellwandbiosynthese beteiligt ist. Dabei ist GpsB essenziell für die Aktivität und die korrekte Funktion von PBP A1. Die Inaktivierung von *gpsB* in *L. monocytogenes* führt zu einem Wachstumsdefekt bei erhöhten Temperaturen. Dieser Phänotyp wird durch die Entstehung von spontanen Suppressormutationen in der Δ *gpsB*-Mutante supprimiert, sodass durch die Genomsequenzierung dieser Suppressorstämme Gene identifiziert werden konnten, die im funktionellen Zusammenhang mit GpsB stehen. Durch die Charakterisierung dieser Suppressorgene wurde die von der ClpCP-Protease regulierte Akkumulation der UDP-GlcNAc 1-carboxyvinyltransferase MurA, welche den ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese katalysiert, als Mechanismus zur Suppression des Hitze-sensitiven Δ *gpsB*-Phänotyps identifiziert.

Innerhalb dieser Arbeit konnte den bis zum jetzigen Zeitpunkt uncharakterisierten *gpsB*-Suppressorgen *reoM* (*lmo1503*) und *reoY* (*lmo1921*) ausgehend von der beobachteten MurA-Akkumulation in den jeweiligen Deletionsstämmen eine Funktion in der ClpCP-abhängigen Degradation von MurA zugeordnet werden. ReoM wurde außerdem als Substrat der Serin/Threonin-Kinase PrkA und der Phosphatase PrpC identifiziert. Durch das Einbringen einer phosphoablative Punktmutation wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von ReoM an Thr7 durch PrkA essenziell ist, da über den Phosphorylierungszustand von ReoM der ClpCP-abhängige Abbau des ebenfalls essenziellen MurA-Proteins reguliert wird. Demzufolge besteht eine Verbindung zwischen der Erkennung von Zellwandfragmenten durch PrkA über die Phosphorylierung von ReoM zur ClpCP-abhängigen Kontrolle der MurA-Stabilität, an welcher ReoY ebenfalls beteiligt ist. Die Stabilisierung von MurA stimulierte ihrerseits die Peptidoglykanbiosynthese, welches in einer erhöhten Cephalosporin-Resistenz resultierte.

Durch den Suppressorscreen wurde weiterhin Lmo1549 als potenzieller Interaktionspartner von GpsB identifiziert. Die Deletion von *lmo1549* im Δ *gpsB*-Hintergrund führte jedoch nur zu einer partiellen, MurA-unabhängigen, Suppression des Wachstumsdefekts bei 42°C. Zudem besitzt die Δ *gpsB* Δ *lmo1549*-Doppelmutante einen Zellteilungsphänotyp. Auf der Suche nach weiteren Interaktionen mit anderen Zellteilungsproteinen konnten sowohl für Lmo1549 als auch für GpsB genetische und physikalische Wechselwirkungen mit den Proteinen des Min-Systems beobachtet werden. Demzufolge besitzt Lmo1549 sehr wahrscheinlich eine Rolle in der Zellteilung von *L. monocytogenes*, welche sich aufgrund der Interaktion mit dem Min-System auf die Ausbildung des Z-Rings auswirken könnte.

Summary

The late cell division protein GpsB has an important function in cell wall biosynthesis in Gram-positive bacteria. In the human pathogen *Listeria monocytogenes* GpsB interacts with the class A penicillin binding protein PBP A1, which polymerizes the peptidoglycan in the last step of cell wall biosynthesis. In this process GpsB is essential for proper PBP A1 activity and function. The inactivation of *gpsB* in *L. monocytogenes* led to a growth defect at elevated temperatures. This phenotype was suppressed by the acquisition of spontaneous suppressor mutations in the Δ *gpsB* mutant. Therefore, genome sequencing of these suppressor strains led to the identification of genes associated with GpsB function. Characterization of these suppressor genes revealed the ClpCP protease regulated accumulation of the UDP-GlcNAc 1 carboxyvinyltransferase MurA, that catalyzes the first step of peptidoglycan biosynthesis, as a mechanism suppressing the heat-sensitive Δ *gpsB* phenotype.

During this work, the so far uncharacterized *gpsB* suppressor genes *reoM* (*lmo1503*) and *reoY* (*lmo1921*) could be assigned a function in the ClpCP-dependent degradation of MurA based on the observed MurA accumulation in each of the corresponding deletion strains. Furthermore, ReoM could be identified as a substrate of the serine/threonine kinase PrkA and the phosphatase PrpC. Introduction of a phosphoablative point mutation showed that phosphorylation of ReoM on Thr7 by PrkA is essential, since the phosphorylation state of ReoM regulates the ClpCP-dependent degradation of the likewise essential MurA protein. Therefore, there is a link between the recognition of cell wall fragments by PrkA via the phosphorylation of ReoM to the ClpCP-dependent control of MurA stability, in which ReoY is also involved. MurA stabilization itself stimulated the peptidoglycan biosynthesis resulting in increased cephalosporin resistance.

During the suppressor screen Lmo1549 has also been identified as a potential GpsB interaction partner. The deletion of *lmo1549* in the Δ *gpsB* background only partially suppressed the growth defect of the Δ *gpsB* mutant at 42°C in a MurA independent manner. However, the Δ *gpsB* Δ *lmo1549* double mutant had a strong cell division phenotype. Screening for further interactions with other cell division proteins revealed genetic and physical interactions of Lmo1549 as well as GpsB with the proteins of the Min-system. Therefore, Lmo1549 most likely has a function in cell division in *L. monocytogenes*, which could, due to the interactions with the MinCDJ proteins, affect Z-ring formation.

1. Einleitung

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist ein Gram-positives, fakultativ-anaerobes und nicht-sporulierendes Bakterium (Farber und Peterkin, 1991; Collins *et al.*, 1991). Die Gattung *Listeria* gehört wie die Gattung *Bacillus* zur Abteilung der *Firmicutes*, welche durch einen niedrigen GC-Gehalt charakterisiert sind (Collins *et al.*, 1991). Die Stäbchen-förmigen Bakterien besitzen eine Größe von 0,5-2 µm (Jamshidi und Zeinali, 2019) und sind peritrich begeißelt (Farber und Peterkin, 1991). Durch die Flagellen ist *L. monocytogenes* bei Temperaturen von 20-25°C motil, bei höheren Temperaturen ist die Expression des Flagellins jedoch reduziert (Peel *et al.*, 1988).

L. monocytogenes kommt ubiquitär vor und ist im Boden, in Abwässern, auf Pflanzenmaterialien und somit auch in landwirtschaftlichen Bereichen (Silage) aufzufinden, wo es als Saprophyt lebt (Welshimer und Donker-Voet, 1971; Weis und Seeliger, 1975; Watkins und Sleath, 1981; Hamon *et al.*, 2006; Freitag *et al.*, 2009). Neben dem Vorkommen als Saprophyt kann *L. monocytogenes* auch als opportunistischer Krankheitserreger auftreten, wobei er erstmals 1929 von Nyfeldt aus infizierten Menschen isoliert und beschrieben wurde (Gray *et al.*, 1966). Von den beschriebenen 17 verschiedenen Arten der Gattung *Listeria* galt *L. monocytogenes* als einziges Humanpathogen. Jedoch wurden *L. ivanovii* und *L. seeligeri* in wenigen Fällen ebenfalls bei Erkrankungen des Menschen nachgewiesen. Eine Infektion von Tieren ist durch *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* möglich (Cossart, 2007; Orsi und Wiedmann, 2016; Robert Koch-Institut, 2015). Von den 13 Serovaren, in die die Spezies *L. monocytogenes* durch Serotypie eingeteilt wird, sind besonders die Serovare 4b, 1/2a und 1/2b mit Erkrankungen des Menschen assoziiert (Thevenot *et al.*, 2006; Lopez-Valladares *et al.*, 2018; Robert Koch-Institut, 2015).

Durch das ubiquitäre Vorkommen kann *L. monocytogenes* in die Nahrungskette eingebracht werden. Dieses erfolgt meist durch die Ernte kontaminierter Nahrungsmittel oder die Fütterung von kontaminiertem Tierfutter. Gelangt *L. monocytogenes* erst einmal in die Produktionskette ist die Ausbreitung des Erregers aufgrund seiner Vermehrungsfähigkeit bei hohen Salzkonzentrationen, niedrigen pH-Werten (bis pH 4,0) und geringen Temperaturen (4-10°C) sowie der Bildung von Biofilmen stark begünstigt (Farber und Peterkin, 1991; Schuchat *et al.*, 1991; Thevenot *et al.*, 2006; Ramaswamy *et al.*, 2007; Colagiorgi *et al.*, 2017).

Die Übertragung auf den Menschen erfolgt meist durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel, zu denen hauptsächlich Rohmilch-, sowie Fleisch- und Fischprodukte,

Meeresfrüchte, aber auch Salat und anderes Gemüse gehören (Farber und Peterkin, 1991; Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007; Lecuit, 2007). Durch eine Inkubationszeit von 5-70 Tagen bei einer invasiven Listeriose ist es jedoch häufig schwierig das für die Infektion verantwortliche Lebensmittel zu identifizieren (Linnan *et al.*, 1988; Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007). Hinzu kommt, dass bei gesunden Menschen meist eine nicht-invasive Listeriose auftritt, welche sich in einer selbst-limitierenden Gastroenteritis äußert und somit nicht zwingend diagnostiziert wird. Bei älteren oder immunsupprimierten Patienten kann jedoch eine invasive Listeriose mit systemischen Verläufen auftreten, welche zu einer Septikämie, einer Meningitis oder einer Enzephalitis führen kann. Bei Schwangeren kann es zudem zum Auftreten von Früh- und Fehlgeburten kommen (Gray *et al.*, 1966; Hamon *et al.*, 2006; Lamont *et al.*, 2011). Die Listeriose ist nach dem deutschen Infektionsschutzgesetz (§7, IfSG) eine meldepflichtige Krankheit, welche mit einer Inzidenz von 701 Fällen im Jahr 2018 deutlich unterhalb der ebenfalls Lebensmittel-assoziierten Salmonellose mit 13.529 Fällen liegt (Robert Koch-Institut, 2019). Jedoch gehört die Listeriose mit einer Letalität von durchschnittlich 7%, welche insbesondere in den Risikogruppen auf 30% ansteigt, zu den meldepflichtigen Krankheiten mit der höchsten Letalitätsrate (Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007; Allerberger und Wagner, 2010; Robert Koch-Institut, 2015).

1.2 Infektionszyklus, Symptomatik und Behandlung der Listeriose

L. monocytogenes gilt aufgrund der Fähigkeit seine Aufnahme in nicht-phagozytische Zellen zu induzieren sowie der Möglichkeit sich intrazellulär zu vermehren und zu verbreiten und damit diverse Wirtsschranken zu überwinden als Modellorganismus für die Untersuchung von Wirts-Pathogen-Interaktionen und bakteriellen Regulationsmechanismen (Radoshevich und Cossart, 2018). Von großer Bedeutung ist die Regulation der Expression der Virulenzgene, welche die verschiedenen Schritte im Infektionszyklus vermitteln. Der Transkriptionsaktivator PrfA reguliert die Expression der Internaline A und B (InlA und InlB), welche für die Invasion von nicht-phagozytischen Zellen, wie Epithelzellen, Endothelzellen, Hepatozyten und Fibroblasten benötigt werden (Lecuit, 2007; de las Heras *et al.*, 2011). Internalin A bindet spezifisch an den Zellmembranrezeptor E-Cadherin der Epithelzellen und Internalin B an Met, den Rezeptor des Hepatozyten-Wachstumsfaktors (hepatocyte growth factor, HGF), welcher in verschiedenen Zelltypen (u.a. Hepatozyten und Fibroblasten) vorkommt (Gaillard *et al.*, 1991; Mengaud *et al.*, 1996; Cossart und Lecuit, 1998; Parida *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2000). Dadurch kommt es zur Rezeptor-vermittelten Endozytose, wodurch die Bakterien nach der Internalisierung von einer

Vakuole umgeben sind, welche auch als Phagosom bezeichnet wird (Cossart und Helenius, 2014) (Abbildung 1). Die Freisetzung der Bakterien aus der Vakuole erfolgt durch die Sekretion des Poren-formenden Toxins Listeriolysin (LLO) und den Phospholipasen PlcA und PlcB, wodurch die Vakuolenmembran lysiert wird und die Bakterien ins Zytosol gelangen (Smith *et al.*, 1995; Cossart und Lecuit, 1998; Hamon *et al.*, 2006; Pizarro-Cerda *et al.*, 2012). Durch die Aufnahme von Stoffwechselprodukten des Wirts kann *L. monocytogenes* im Zytosol der Wirtszelle überleben und sich dort vermehren (Joseph und Goebel, 2007; Chen *et al.*, 2017). Dabei wird ein weiterer Oberflächen-verankerter Virulenzfaktor exprimiert, welcher als ActA (actin assembly-inducing protein) bezeichnet wird, da er in der Lage ist Aktin-Moleküle der Wirtszelle zu polymerisieren. Durch die polare Anlagerung der Aktinfilamente entsteht ein Aktinschwanz, welcher dem Bakterium eine inter- und intrazelluläre Fortbewegung ermöglicht. Die dabei entstehende Kraft ist so stark, dass auch ein Durchtritt in benachbarte Zellen möglich ist (Vazquez-Boland *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992; Gouin *et al.*, 2005; Travier und Lecuit, 2014). Durch den Übergang in eine anliegende Zelle, werden die Bakterien von einer sekundären Vakuole mit einer Doppelmembran umgeben. Während die Phospholipasen PlcA und PlcB die innere Membran lysieren, ermöglicht LLO die Lyse der äußeren Membran, sodass ein neuer Infektionszyklus beginnen kann (Pizarro-Cerda *et al.*, 2016).

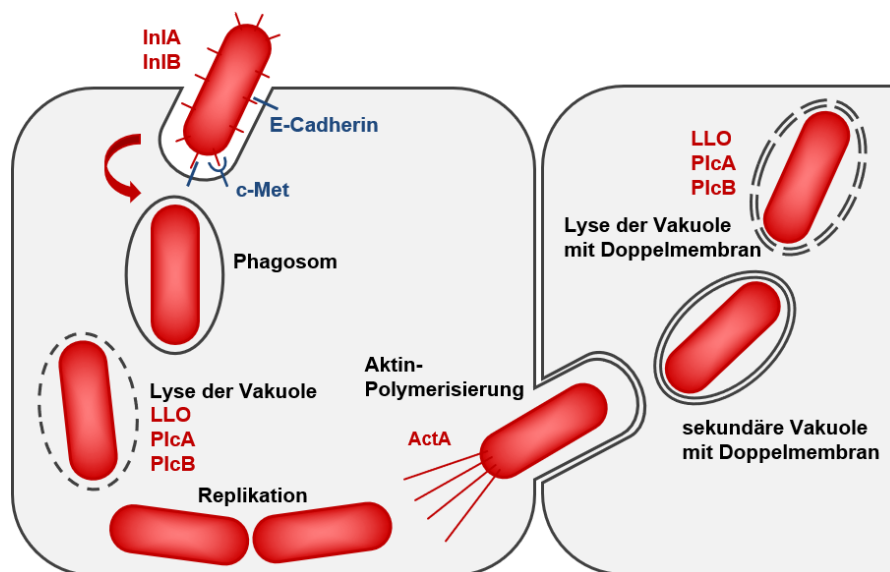


Abbildung 1: Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes*. Schematische Darstellung der Invasion in nicht-phagozytische Zellen. Über die Rezeptor-vermittelte Endocytose, welche durch InlA und InlB vermittelt wird, gelangt *L. monocytogenes* ins Zytosol der Wirtszelle. Dabei werden die Bakterien durch die Internalisierung von einer Vakuole umgeben. Die Vakuolenmembran kann durch die Expression des Poren-formenden Toxins Listeriolysin (LLO) und der Phospholipasen PlcA und PlcB lysiert werden, wodurch die Bakterien im Zytosol freigesetzt werden und sich vermehren können. Durch die polare Anlagerung der Aktinfilamente des Wirts durch ActA können sich die Bakterien

im Zytosol fortbewegen und in benachbarte Zellen eindringen. Die dabei entstehende Umhüllung mit einer Doppelmembran kann durch die Virulenzfaktoren LLO, PlcA und PlcB durchbrochen werden, wodurch ein neuer Infektionszyklus beginnen kann (modifiziert nach (Cabrita *et al.*, 2014)).

Durch diese intrazelluläre Lebensweise gelangt *L. monocytogenes* nach der Aufnahme kontaminierter Lebensmittel über die Invasion der Darmepithelzellen ins tieferliegende Gewebe und von dort über das Blut- und Lymphsystem in die Leber und die Milz, wo die Bakterien sich weiter vermehren (Schlech *et al.*, 1983; Lecuit, 2007; Radoshevich und Cossart, 2018). Bei Individuen mit einem intakten Immunsystem, kann die weitere systemische Ausbreitung des Erregers durch die Immunantwort abgewehrt werden und es zeigen sich Symptome einer Gastroenteritis. Bei Menschen mit einem geschwächten Immunsystem, sowie bei Kindern und älteren Menschen, kann es zudem durch einen Übertritt der Blut-Hirnschranke zu einer Entzündung der Hirnhaut oder des Gehirns kommen. Durch eine Überschreitung der Plazentaschranke kann es bei Schwangeren außerdem zu einer Infektion des Fetus kommen, welches wiederum zu Früh- und Fehlgeburten führen kann. Somit kann *L. monocytogenes* sowohl die Darmbarriere als auch die Blut-Hirnschranke und die Plazentaschranke überqueren (Schlech *et al.*, 1983; Cossart und Lecuit., 1998; Doganay, 2003; Disson *et al.*, 2008).

Die Behandlung der Listeriose erfolgt durch eine Verabreichung der β -Lactam-Antibiotika Ampicillin, Amoxicillin oder Penicillin (Hof, 1991). Die Wirkung der Penicilline ist lediglich bakteriostatisch, sodass versucht wurde durch ihre Kombination mit dem Proteinbiosyntheseinhibitor Gentamycin einen bakteriziden Effekt zu erreichen (Gordon *et al.*, 1972; Azimi *et al.*, 1979; Temple und Nahata, 2000). Aufgrund des intrazellulären Wachstums der Bakterien müssen hohe Dosen der Antibiotika verabreicht werden, damit diese bis zum Wirkungsort vordringen können (Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007). Insgesamt wird die Kombination der β -Lactam-Antibiotika mit Gentamycin aufgrund der lediglich im Tiermodell bestätigten synergistischen Effekte und der extrazellulären Wirkung von Gentamycin kontrovers diskutiert (Blanot *et al.*, 1999; Temple und Nahata, 2000). Im Gegensatz zu anderen opportunistischen Pathogenen, wie *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecalis*, welche häufig bei nosokomialen Infektionen auftreten (Jones *et al.*, 2004), konnten für klinische *L. monocytogenes*-Isolate keine erhöhten Antibiotika-Resistenzen gegen die in der Therapie eingesetzten Antibiotika beobachtet werden (Hansen *et al.*, 2005). Jedoch konnte bei Tier- und Umweltisolaten eine Zunahme von Antibiotika-Resistenzen festgestellt werden (Srinivasan *et al.*, 2005). Gegen Cephalosporine und alte Chinolone ist *L. monocytogenes* natürlich resistent (Troxler *et al.*, 2000; Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007).

1.3 Zellwachstum, Zellteilung und Regulationsmechanismen

1.3.1 Peptidoglykanbiosynthese

Angriffspunkt vieler Antibiotika, wie beispielsweise der β -Lactam Antibiotika, ist die Biosynthese des Peptidoglykans (Mercier *et al.*, 2013). Das Peptidoglykan ist als Bestandteil der bakteriellen Zellwand von großer Bedeutung für die osmotische und morphologische Stabilität der Zellen und damit auch für die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit der Bakterien (Vollmer *et al.*, 2008a). Mit mehr als 10^9 Da gehört der Peptidoglykan-Sacculus zu den größten beschriebenen Makromolekülen der Bakterienzelle und die Synthese und Hydrolyse des Peptidoglykans während des Zellwachstums und der Zellteilung erfordert demzufolge eine präzise Regulation (Vollmer *et al.*, 2008a; Egan *et al.*, 2017).

Das Peptidoglykan besteht aus Glykansträngen aus alternierenden *N*-Acetylglucosamin- und *N*-Acetylmuraminsäureresten, welche über eine β -1 \rightarrow 4-glykosidische Bindung verknüpft und über kurze Peptide quervernetzt werden (Ghuysen, 1968; Schleifer und Kandler, 1972). Durch diese netzartige Struktur ist einerseits die nötige Stabilität gegeben die zelluläre Integrität aufrechtzuerhalten, aber auch die Möglichkeit die Zellform an die Veränderungen während des Wachstums und der Zellteilung anzupassen (Lovering *et al.*, 2012).

Der erste Schritt der Peptidoglykanbiosynthese beginnt im bakteriellen Zytoplasma mit dem von MurA katalysierten Transfer einer Enolpyruvyl-Gruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) (Du *et al.*, 2000; Kock *et al.*, 2004) (Abbildung 2). MurA ist eine UDP-*N*-Acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase, welche in Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* und auch in Gram-positiven Organismen wie *L. monocytogenes* essenziell ist (Brown *et al.*, 1995; Rismondo *et al.*, 2017). Dabei besitzen viele Gram-positive Organismen neben MurA noch eine zweite UDP-*N*-Acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase (MurZ in *L. monocytogenes*, MurAB in *B. subtilis*) (Du *et al.*, 2000; Kock *et al.*, 2004; Rismondo *et al.*, 2017). Die Kristallstruktur von MurA wurde für verschiedene Spezies (u.a. *E. coli* MurA) bestimmt und zeichnet sich durch zwei globuläre Domänen aus. Das aktive Zentrum befindet sich zwischen diesen beiden Domänen, welche nach der Bindung der Substrate (PEP und UDP-GlcNAc) durch eine Konformationsänderung eine geschlossene Form einnehmen und so die Substrate umschließen (Skarzynski *et al.*, 1996; Lovering *et al.*, 2012). Das Antibiotikum Fosfomycin ist in der Lage MurA zu inaktivieren, da es aufgrund seiner Ähnlichkeit zu PEP die Aminosäure Cys115 (*E. coli* Sequenznummerierung) im aktiven Zentrum irreversibel kovalent bindet (Kahan *et al.*, 1974; Marquardt *et al.*, 1994).

Im zweiten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese wird Enolpyruvyl-UDP-GlcNAc über die Reductase MurB zu UDP-*N*-Acetylmuramin (UDP-MurNAc) umgesetzt, wofür NADPH benötigt wird (Benson *et al.*, 1995). Durch die ATP-abhängigen Aminosäureligasen MurC-F werden Aminosäuren nacheinander an UDP-MurNAc ligiert, sodass das UDP-MurNAc-Pentapeptid entsteht (van Heijenoort, 2001; Smith, 2006). Neben D- und L-Aminosäuren beinhaltet das Pentapeptid eine dibasische Aminosäure, welche für die Quervernetzung der Peptide benötigt wird. Dabei handelt es sich in den meisten Gram-negativen Organismen um *meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*-Dap) (Ghuysen, 1968; Scheffers und Pinho, 2005). Obwohl in vielen Gram-positiven Spezies L-Lysin in das Pentapeptid eingebaut wird, besteht das Pentapeptid des Peptidoglykans in *L. monocytogenes* aus L-Ala-D-Glu-*meso*-Dap-D-Ala-D-Ala (Schleifer und Kandler, 1972; Navarre und Schneewind, 1999; Scheffers und Pinho., 2005). Mit Hilfe des integralen Membranproteins MraY wird das MurNAc-Pentapeptid im Zytoplasma auf einen Undecaprenyl-Phosphatcarrier (C₅₅-P, UP), auch Bactoprenol genannt, transferiert, welcher für den Transport durch die hydrophobe Plasmamembran benötigt wird. Das entstehende Produkt aus dem MurNAc-Pentapeptid und dem Bactoprenol, welches von der zytoplasmatischen Seite gebunden wird, wird als Lipid I bezeichnet (Bouhss *et al.*, 2004). Durch MurG wird der Transfer von GlcNAc von UDP-GlcNAc auf Lipid I katalysiert, wodurch Lipid II gebildet wird (Scheffers und Pinho, 2005; Bouhss *et al.*, 2008). Im nächsten Schritt wird Lipid II auf die äußere Seite der Plasmamembran transferiert, welches über sogenannte Flippasen katalysiert wird (Scheffers und Pinho, 2005). In *E. coli* erfolgt die Translokation von Lipid II durch MurJ, wobei aufgrund der Essenzialität vermutet wird, dass MurJ die einzige Flippase in *E. coli* ist (Sham *et al.*, 2014). Für MurJ (YtgP) und Amj (YdaH) ist eine Funktion als Lipid II-Flippase in *B. subtilis* beschrieben (Meeske *et al.*, 2015). Lange vor der Beschreibung von MurJ wurde für die integralen Membranproteine FtsW und RodA eine Funktion als potenzielle Lipid II-Flippasen vermutet (Ehlert und Holtje, 1996). FtsW ist ein essenzielles Zellteilungsprotein und RodA ist an der Elongation und der Aufrechterhaltung der Stäbchenform beteiligt. Zusammen mit SpoVE gehören sie zu der SEDS- (shape, elongation, division and sporulation) Proteinfamilie (Henriques *et al.*, 1998; Gerard *et al.*, 2002). In *E. coli* konnte eine FtsW-abhängige Translokation von Lipid II in Membranvesikeln erstmals 2011 von Mohammadi *et al.* beobachtet werden (Mohammadi *et al.*, 2011). In aktuellen Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass FtsW und RodA eine Funktion als Transglykosylase in der Polymerisierung des Peptidoglykans besitzen (Meeske *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2016; Emami *et al.*, 2017; Taguchi *et al.*, 2019).

Nach der Translokation von Lipid II auf die Außenseite der Zytoplasmamembran wird dessen Disaccharid-Untereinheit in die wachsende Peptidoglykankette eingebaut. Dieser Einbau erfolgt

über eine Transglykosylierung, bei der der reduzierte MurNAc-Rest der wachsenden Peptidoglykankette mit dem GlcNAc des Lipid II-Moleküls über eine β -1 \rightarrow 4-NAM-NAG Bindung verbunden wird (Van Heijenoort *et al.*, 1978; van Heijenoort, Y. und van Heijenoort, J., 1980). Diese Bindung erfolgt unter Abspaltung des Lipidcarriers Bactoprenol in einer phosphorylierten Form (Undecaprenyldiphosphat, UPP). Nach einer Dephosphorylierung kann das Bactoprenol (UP) von der Außenseite über die Plasmamembran in das Zytoplasma transportiert werden und kann dort für weitere Syntheseschritte wiederverwendet werden (Scheffers und Pinho, 2005; Lovering *et al.*, 2012). Dieser Schritt ist der Angriffspunkt des nicht-ribosomalen Peptid-Antibiotikums Bacitracin, welches UPP bindet und somit die Dephosphorylierung zu Undecaprenylphosphat (UP) inhibiert (Siewert und Strominger, 1967).

Die Transglykosylierung der Peptidoglykanstränge wird durch die Glykosyltransferase (GT)-Domäne von Penicillin-bindenden Proteinen (PBP) katalysiert, welche spezifisch durch das Phosphoglykolipid Moenomycin inhibiert werden können (Huber und Nesemann, 1968; Bertsche *et al.*, 2005). Neben den PBPs wurde zusätzlich für FtsW und RodA eine Funktion als Transglykosylase gezeigt, sodass diese ebenfalls eine bedeutende Funktion in der Polymerisierung des Peptidoglykans einnehmen und als Zielstruktur für die Entwicklung neuer Antibiotika dienen können (Meeske *et al.*, 2016; Emami *et al.*, 2017).

Die PBPs werden in zwei große Kategorien unterteilt: die High-molecular-weight (HMW) PBPs und die Low-molecular-weight (LMW) PBPs (Sauvage *et al.*, 2008). Die HMW PBPs sind multimodulare, Membran-verankerte Enzyme, welche in zwei Klassen unterteilt werden. Klasse A HMW PBPs sind bifunktionale Enzyme, welche neben der N-terminalen Glykosyltransferase (GT)-Domäne, eine C-terminale Transpeptidase (TP)-Domäne besitzen, die für die Quervernetzung der Peptide der einzelnen Glykanstränge verantwortlich ist. Die Klasse B HMW PBPs werden als monofunktional bezeichnet, da diese nur die C-terminale Transpeptidase-Domäne besitzen und eine N-terminale Domäne, welche mit anderen Funktionen, wie der Interaktion mit anderen Zellteilungsproteinen, assoziiert ist (Goffin und Ghuysen, 1998; Sauvage *et al.*, 2008). Die Transpeptidierung des Peptidoglykans erfolgt unter Spaltung der D-Ala-D-Ala-Bindung im Pentapeptid und dem anschließenden Transfer der Peptidyl-Einheit auf die dibasische Aminosäure im benachbarten Peptid (Blumberg und Strominger, 1974; Navarre und Schneewind, 1999; Scheffers und Pinho, 2005). Die β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin und Ampicillin weisen eine strukturelle Ähnlichkeit zum D-Ala-D-Ala des Pentapeptids auf und können somit als Substrat von der Transpeptidase gebunden werden. Dabei entsteht eine kovalente Bindung mit dem Serin im aktiven Zentrum der Transpeptidase, wodurch die Aktivität

und damit auch die Quervernetzung des Peptidoglykans inhibiert wird (Tipper und Strominger, 1965; Macheboeuf *et al.*, 2006).

Die HMW PBPs katalysieren die Polymerisierung und die Quervernetzung des Peptidoglykans, wohingegen die LMW PBPs eine gegenteilige Funktion besitzen. LMW PBPs sind DD-Peptidasen, welche durch ihre Endopeptidase- oder DD-Carboxypeptidase-Aktivität die Quervernetzungen des Peptidoglykans hydrolysieren oder deren Ausbildung durch die Abspaltung des terminalen D-Ala des Pentapeptids verhindern können. Demzufolge sind die LMW PBPs von großer Bedeutung für die Zellseparation und bestimmen den Vernetzungsgrad des Peptidoglykans (Sauvage *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2008b).

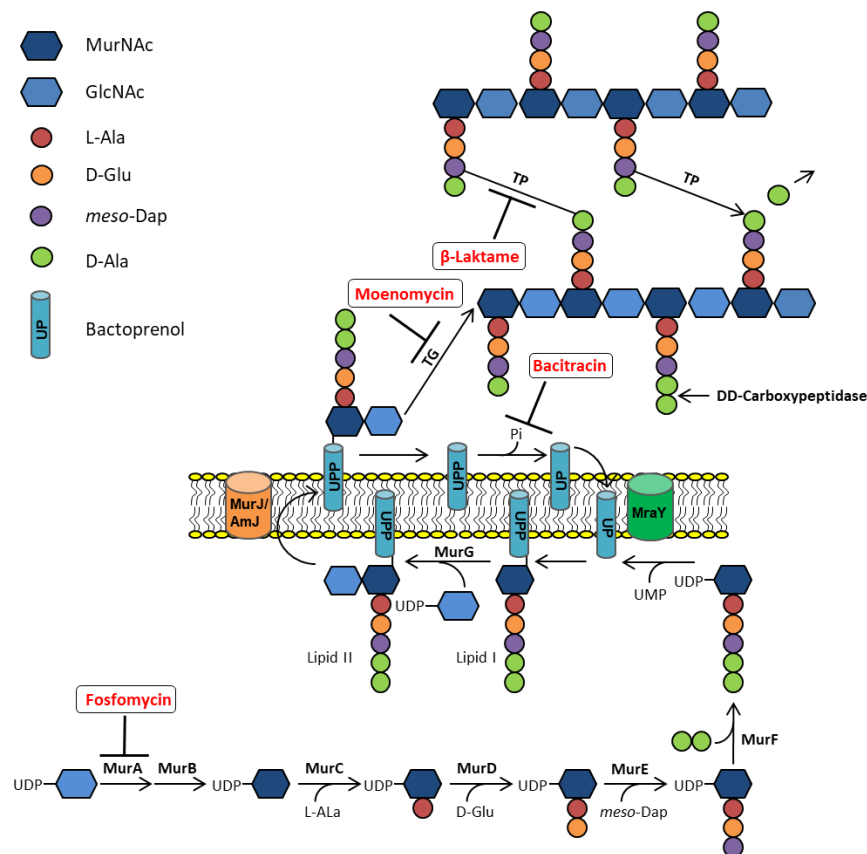


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Peptidoglykanbiosynthese. Im Zytoplasma katalysieren die Enzyme MurA-MurF die Bildung des UDP-MurNac-Pentapeptids. Durch MurA wird das Pentapeptid von der zytosolischen Seite an Bactoprenol, UP, gebunden. Diese Vorstufe wird als Lipid I bezeichnet. Durch MurG wird GlcNAc auf Lipid I übertragen, wodurch Lipid II entsteht. Durch die Flippasen MurJ und AmJ wird das Lipid II-Molekül auf die äußere Seite der Zytoplasmamembran transferiert. Auf der äußeren Seite wird das Lipid II-Molekül durch eine Transglykosylase (TG) mit dem MurNac-Rest des wachsenden Peptidoglykanstrangs verknüpft. Die Quervernetzung der Pentapeptide erfolgt durch eine Transpeptidase (TP) unter Abspaltung des terminalen D-Ala. Diese Verknüpfung der Pentapeptide kann durch die Abspaltung des terminalen D-Ala durch DD-Carboxypeptidasen unterbunden werden. Bactoprenol wird nach dem Einbau des Pentapeptids dephosphoryliert und wieder auf die zytoplasmatische

Seite transferiert, wo es für den erneuten Transfer eines Pentapeptids genutzt wird (modifiziert nach (McCallum *et al.*, 2011; Typas *et al.*, 2011; Lovering *et al.*, 2012; Pinho *et al.*, 2013; Piepenbreier *et al.*, 2019)).

1.3.2 Zellwachstum und Zellteilung

Der koordinierte Ablauf der Peptidoglykansynthese und -hydrolyse ist auch im Zusammenhang mit dem Zellwachstum und der Zellteilung von großer Bedeutung, wobei gleichzeitig die Zellform aufrechterhalten werden muss. In *B. subtilis*, wie in vielen anderen Stäbchen-förmigen Bakterien, erfolgt die Bestimmung der Zellform durch Proteine der MreB-Familie. Diese Proteine sind strukturell und biochemisch verwandt mit dem eukaryotischen Aktin und sind ebenfalls in der Lage über ATP-Bindung und -hydrolyse reversibel zu polymerisieren (Errington und Wu, 2017). Das *mreB*-Gen wurde erstmals im Zusammenhang mit Mutationen beschrieben, die die Zellform von *E. coli* verändern (Wachi *et al.*, 1987; Errington und Wu, 2017). Die ersten Genomsequenzierungen zeigten, dass in *B. subtilis* insgesamt drei *mreB*-Paraloge vorliegen (*mreB*, *mbl* und *mreBH*) (Levin *et al.*, 1992; Varley und Stewart, 1992; Abhayawardhane *et al.*, 1995; Errington und Wu, 2017). Die Lokalisation von *mreB* upstream von *mreC* und *mreD*, welche ebenfalls in der Zellelongation involviert sind, ist in vielen Stäbchen-förmigen Spezies konserviert (Errington und Wu, 2017). Lokalisationsstudien zeigten, dass sich kurze MreB-Filamente kreisförmig in den Zellen von *E. coli* (Garner *et al.*, 2011; Dominguez-Escobar *et al.*, 2011) und *B. subtilis* (van Teeffelen und Gitai, 2011) bewegen, wobei die Bewegung abhängig von dem Ort der aktiven Zellwandsynthese ist. Demzufolge wurde vermutet, dass MreB eine Art Gerüst bildet, welches dabei hilft, die verschiedenen Proteine, welche für die Peptidoglykansynthese, die Wandteichonsäuresynthese oder andere Zellwand-assoziierte Elemente benötigt werden, zusammen zu lagern (Dominguez-Escobar *et al.*, 2011; Errington und Wu, 2017). Diese Hypothese wird durch Beobachtungen wie die Interaktion von MreB mit den Enzymen der Peptidoglykanbiosynthese, MraY und MurG, in *E. coli* (Mohammadi *et al.*, 2007) und *Caulobacter crescentus* (White *et al.*, 2010) unterstützt. Darüber hinaus wurde eine Zusammenlagerung von MreBCD, RodA und verschiedenen Penicillin-bindenden Proteinen zu einem Protein-Komplex beschrieben, welcher als Elongasom bezeichnet wird und für die laterale Zellwandbiosynthese und die Aufrechterhaltung der Zellform verantwortlich ist (Kruse *et al.*, 2005; Leaver und Errington, 2005; Sieger *et al.*, 2013) (Abbildung 3, A).

Bei Stäbchen-förmigen Bakterien erfolgt die Zellteilung nach dem lateralen Zellwachstum in der Mitte der Zelle, wodurch zwei identische Tochterzellen entstehen (Errington und Wu, 2017). In Bakterien beginnt die Zellteilung mit der Bildung des FtsZ-Rings in der Mitte der Zelle (Bi und

Lutkenhaus, 1991). FtsZ ist strukturell und biochemisch homolog zum Tubulin der Eukaryoten. Beide Proteine können zu einzelsträngigen Protofilamenten polymerisieren, welche sich wiederum zu größeren Bündeln oder Ring-ähnlichen Strukturen zusammenlagern können. Die Protofilamente sind hoch dynamisch und befinden sich in einem ständigen Auf- und Abbau, welcher durch GTP-Bindung und -hydrolyse reguliert wird (RayChaudhuri und Park, 1992; de Boer *et al.*, 1992; Mukherjee und Lutkenhaus, 1994; Löwe und Amos, 1998). Der FtsZ-Ring rekrutiert direkt oder indirekt weitere Proteinkomponenten des Zellteilungsapparats, welcher auch als Divisom bezeichnet wird (Abbildung 3, B), zur Zellmitte (Adams und Errington, 2009; Egan und Vollmer, 2013). Durch Lokalisierungsstudien lässt sich vermuten, dass sich die Assemblierung des Divisoms in zwei Schritte unterteilt (Gamba *et al.*, 2009). In *B. subtilis* erfolgt im ersten Schritt die Bildung des Z-Rings und die parallele Rekrutierung der frühen Zellteilungsproteine FtsA, SepF, ZapA und EzrA. Im zweiten Schritt werden die späten Zellteilungsproteine FtsW, DivIB, FtsL, DivIC, und PBP2b in der Zellmitte lokalisiert. Die regulatorischen Proteine DivIVA, GpsB, MinJ, MinD und MinC konnten zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie die späten Zellteilungsproteine am Z-Ring detektiert werden (Gamba *et al.*, 2009; Errington und Wu, 2017). Die Zellteilungsproteine SepF und ZapA unterstützen die Bildung des Z-Rings durch die Stabilisierung der FtsZ-Protofilamente (Gueiros-Filho und Losick, 2002; Hamoen *et al.*, 2006). Darüber hinaus können SepF und FtsA den Z-Ring über eine amphipathische Helix in der Membran verankern (Pichoff und Lutkenhaus, 2005; Duman *et al.*, 2013). Das Zellteilungsprotein EzrA kommt ausschließlich in Gram-positiven Organismen vor und ist ein negativer Regulator der Z-Ringbildung. Darüber hinaus ist EzrA an der Rekrutierung von PBP1 zum Teilungsseptum beteiligt (Levin *et al.*, 1999; Claessen *et al.*, 2008). Die Zellteilungsproteine DivIB, FtsL und DivIC treten als Proteinkomplex auf, wobei die Komplexbildung durch DivIB gefördert wird (Daniel *et al.*, 2006; Masson *et al.*, 2009). Innerhalb dieses Komplexes sind FtsL und DivIC für die Rekrutierung weiterer später Zellteilungsproteine zum Septum verantwortlich, wie beispielsweise PBP2b (Daniel *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2006). Die PBPs werden für die Peptidoglykansynthese am Teilungsseptum und das laterale Zellwachstum benötigt. PBP2b, welches eine C-terminale Transpeptidase-Domäne besitzt, ist dabei essenziell für die septale Peptidoglykanbiosynthese (Nanninga, 1991; Yanouri *et al.*, 1993; Daniel *et al.*, 1996; Daniel *et al.*, 2000). Die zum Einbau in die wachsende Peptidoglykankette benötigten Lipid II-Moleküle werden über die Flippase MurJ auf die äußere Seite der Plasmamembran transferiert (Meeske *et al.*, 2015).

Nach aktuellen Modellen erfolgt die eigentliche Zellteilung durch eine Einschnürung der Zellmembran, welche durch einen immer stärker abnehmenden Radius des um das Septum zirkulierenden PG-Synthese-Komplexes bedingt ist (Bisson-Filho *et al.*, 2017).

Weiterhin zum Zellteilungsseptum rekrutiert werden die späten Zellteilungsproteine GpsB (siehe Kapitel 1.3.5) und DivIVA sowie die Proteine des Min-Systems. DivIVA ist in Gram-positiven Bakterien hochkonserviert (Oliva *et al.*, 2010; Kaval und Halbedel, 2012; Halbedel *et al.*, 2019) und bindet bevorzugt an negativ gekrümmte Membranen, wie sie an den Teilungssepten oder an den Zellpolen vorzufinden sind (Lenarcic *et al.*, 2009; Ramamurthi und Losick, 2009; Eswaramoorthy *et al.*, 2011). Während der Zellteilung wird DivIVA benötigt, um die Komponenten des Min-Systems am Zellteilungsort zu lokalisieren. Dabei interagiert DivIVA in *L. monocytogenes* sowohl mit MinJ als auch mit MinD (Kaval *et al.*, 2014), wohingegen in *B. subtilis* lediglich eine Interaktion mit MinJ beobachtet werden konnte (Bramkamp *et al.*, 2008; van Baarle und Bramkamp, 2010). Dadurch verläuft die Rekrutierung des MinCD-Komplexes in *B. subtilis* über das Transmembranprotein MinJ, während dieser in *L. monocytogenes* direkt durch DivIVA rekrutiert wird (Bramkamp *et al.*, 2008; van Baarle und Bramkamp, 2010; Kaval *et al.*, 2014). MinC inhibiert die Anlagerung der einzelnen FtsZ-Protofilamente zu größeren Komplexen (Dajkovic *et al.*, 2008; Blasios *et al.*, 2013) und verhindert somit die Bildung des Z-Rings (Gregory *et al.*, 2008). Dabei wird MinC durch die Membran-assoziierte ATPase MinD reguliert (Marston *et al.*, 1998; Marston und Errington, 1999). Dieser regulatorische Mechanismus dient zur Inhibierung der Bildung des Z-Rings an den neu entstandenen Zellpolen nach der Zellteilung (Gregory *et al.*, 2008; van Baarle und Bramkamp, 2010). Darüber hinaus konnte in *B. subtilis* gezeigt werden, dass Komponenten des Zellteilungsringes wie FtsA, FtsL und PBP 2b in der Abwesenheit von MinC, MinD und MinJ an den neu gebildeten Zellpolen verbleiben. Aufgrund dieser Lokalisationsdaten ist zu vermuten, dass die Min-Proteine nach der Zellteilung für eine vollständige Disassemblierung des Divisoms verantwortlich sind, welches verhindert, dass eine weitere Zellteilung in der Nähe der Zellpole unter Bildung von Mini-Zellen erfolgt. Damit verhindert das Min-System nicht nur die FtsZ-Polymerisation, sondern trägt auch zur Inhibition von Prozessen downstream von FtsZ bei, sodass die Bildung von Mini-Zellen unterbunden wird und nur eine Teilung innerhalb eines Zellzyklus erfolgt (van Baarle und Bramkamp, 2010). In *L. monocytogenes* beeinflusst DivIVA neben der Zellteilung die SecA2-abhängige Sekretion der Autolysine p60 und MurA (NamA), welche für eine vollständige Trennung der Tochterzellen benötigt werden (Lenz und Portnoy, 2002; Machata *et al.*, 2005; Halbedel *et al.*, 2012). Weiterhin hat DivIVA einen Effekt auf die Sporenbildung von *B. subtilis* (Thomaides *et al.*, 2001) sowie die Fähigkeit von *B. subtilis*-Zellen DNA aus der Umgebung

aufzunehmen (Briley *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2012). In *L. monocytogenes* hat eine *divIVA*-Deletionsmutante zudem einen starken Virulenzdefekt (Halbedel *et al.*, 2012).

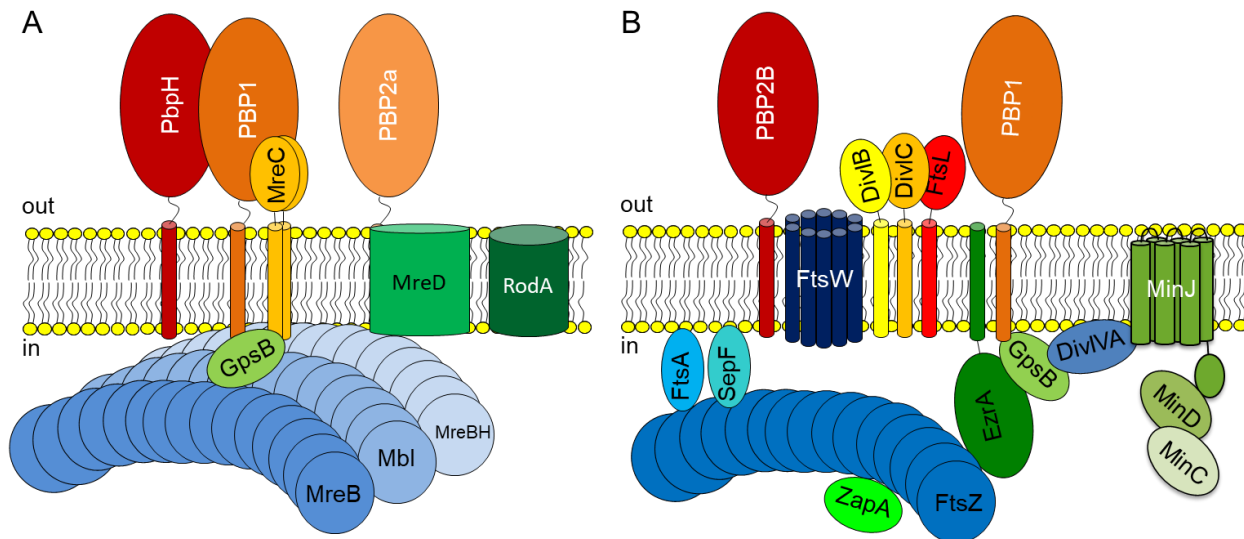


Abbildung 3: (A) Schematische Darstellung der Zusammenlagerung von MreBCD, sowie der MreB-Homologen, RodA und verschiedenen PBPs zum Elongasom von *B. subtilis*, welches für das laterale Zellwachstum und die Aufrechterhaltung der Zellform verantwortlich ist (modifiziert nach (Carballido-Lopez und Formstone, 2007; Claessen *et al.*, 2008; Adams und Errington, 2009)). (B) Schematische Darstellung der Zusammenlagerung der Zellteilungsproteine und Zellteilungs-assoziierten Komponenten zum Divisom von *B. subtilis* (modifiziert nach (Halbedel und Lewis, 2019)).

1.3.3 Regulation bakterieller Lebensvorgänge durch ClpCP-abhängigen Proteinabbau

Die Degradation von Proteinen durch Proteolyse ist von großer Bedeutung für die Proteinhomöostase, aber auch für die Adaption an sich verändernde Umweltbedingungen, wie beispielsweise Hitzestress und Nährstoffmangel (Frees *et al.*, 2007; Kirstein *et al.*, 2007; Kirstein *et al.*, 2009b). Auch Zellteilungsproteine und Proteine mit Funktionen in der Peptidoglykanbiosynthese unterliegen zum Zwecke des Protein-Turnovers und der Regulation beider Prozesse dem proteolytischen Abbau durch Proteasen (Camberg *et al.*, 2009; Sass *et al.*, 2011).

Am proteolytischen Abbau von Proteinen, inklusive falsch-gefalteter oder aggregierter Proteine, sind Hsp100/Clp-Proteine der AAA+-Superfamilie (ATPase associated with diverse cellular activities) beteiligt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um ATP-abhängige Chaperone (Wickner *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004; Erzberger und Berger, 2006). Die AAA+-Proteine, wie ClpC, ClpA oder ClpX, bilden ringförmige Hexamere mit einer engen Öffnung in der Mitte des Rings und sind direkt mit einem Fass-ähnlichen Protease-Komplex (ClpP, ClpQ) verbunden.

Durch die Hydrolyse von ATP wird das gebundene Substrat entfaltet und gelangt als entfaltete Polypeptidkette durch die zentrale Pore in die assoziierte Protease-Untereinheit, wo die Peptidbindungen hydrolysiert werden (Lupas *et al.*, 1997; Wickner *et al.*, 1999; Weber-Ban *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 2001; Sauer *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005; Kirstein *et al.*, 2009b). Mutanten in den AAA+-Proteasen (wie *ftsH* in *B. subtilis*) und den ClpC-ATPasen zeigen vielfältige Phänotypen, wie beispielsweise filamentöses Wachstum, eine hohe Sensitivität gegenüber Salz- und Hitzestress und den Verlust der Sporulationsfähigkeit (Krüger *et al.*, 1994; Rouquette *et al.*, 1996; Deuerling *et al.*, 1997; Lysenko *et al.*, 1997; Ito und Akiyama, 2005). In einigen pathogenen Organismen, wie *S. aureus* (Gunaratnam *et al.*, 2019), *E. faecalis* (Cassenego *et al.*, 2016) und *L. monocytogenes* (Rouquette *et al.*, 1996), besteht ein Zusammenhang der Hsp100/Clp-Proteine zur Virulenz und zur Überlebensfähigkeit der Bakterien im Zytosol (Butler *et al.*, 2006; Frees *et al.*, 2007).

Die AAA+-Proteine sind direkt in die Erkennung der Substrate involviert und können verschiedene Substrate mit unterschiedlich starken Affinitäten binden (Kirstein *et al.*, 2009b). Um als Substrat erkannt zu werden, besitzen die Proteinsubstrate verschiedene Erkennungssequenzen, welche als Degrons bezeichnet werden und das Protein für den Abbau markieren (Varshavsky, 1991; Ravid und Hochstrasser, 2008). Neben den Erkennungssequenzen die sich am N-Terminus (N-Degron) oder am C-Terminus (SsrA-Tag) befinden, sind auch Degrons bekannt, die innerhalb der Proteinsequenz liegen (Flynn *et al.*, 2003; Erbse *et al.*, 2006). Oft ist auch ein Spaltungsereignis Voraussetzung für die Exposition der Erkennungssequenz (Neher *et al.*, 2003; Flynn *et al.*, 2004). Die Erkennung dieser Zielsequenzen kann über die zusätzlichen N-/I- Domänen oder über konservierte Aminosäurereste und Loop-Strukturen an der Pore der AAA+-Domäne erfolgen (Schlieker *et al.*, 2004; Hinnerwisch *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2008; Kirstein *et al.*, 2009b). Zusätzlich gibt es eine Reihe von unabhängigen Proteinen, welche als Adapterproteine bezeichnet werden und die AAA+-Domänen modulieren und somit das Substratspektrum erweitern (Baker und Sauer, 2006; Kirstein *et al.*, 2009b). Die meisten der Hsp100/Clp-Proteine sind auch unabhängig von einem Adapterprotein aktiv (Elsholz *et al.*, 2011). Für ClpC, eine AAA+-ATPase aus *B. subtilis*, konnte jedoch gezeigt werden, dass spezifische Adapterproteine sowohl für die Substraterkennung durch ClpC als auch für die Aktivität von ClpC benötigt werden (Turgay *et al.*, 1998; Schlothauer *et al.*, 2003; Kirstein *et al.*, 2007).

Eines der ersten identifizierten Adaptermoleküle für ClpC von *B. subtilis* war MecA (Turgay *et al.*, 1998). MecA vermittelt nicht nur die Erkennung von spezifischen Substraten, wie dem Schlüsselregulator der Kompetenzentwicklung, ComK, sondern auch die von falsch-gefalteten

und aggregierten Proteinen (Schlothauer *et al.*, 2003). In nicht-kompetenten Zellen inhibiert MecA die ComK-Aktivität, indem ComK direkt zur ClpCP-abhängigen Degradation überführt wird (Turgay *et al.*, 1998; Kirstein *et al.*, 2009b). Über die Quorum-Sensing-vermittelte Initiation der Kompetenzentwicklung wird ComS synthetisiert, welches ebenfalls MecA bindet. Dadurch wird ComK freigesetzt und entgeht der Degradation durch ClpCP, sodass die weiteren benötigten Kompetenzgene exprimiert werden können (Magnuson *et al.*, 1994; Turgay *et al.*, 1997; Turgay *et al.*, 1998; Prepiak und Dubnau, 2007). Ein weiteres Adapterprotein von ClpC in *B. subtilis* ist die Kinase McsB, welche essenziell für die Regulation der Proteolyse des Klasse III Hitzeschock-Regulators CtsR bei Hitze-Stress ist. Dabei wird die Proteinkinase McsB durch den Aktivator McsA aktiviert und kann nach erfolgter Autophosphorylierung (McsB-P) den Repressor CtsR inhibieren und phosphorylieren, wodurch dieser letztendlich zur ClpCP-abhängigen Degradation überführt wird (Kirstein und Turgay, 2005; Kirstein *et al.*, 2007; Kirstein *et al.*, 2009b).

Durch Pulse-Chase-Labeling-Experimente mit ^{35}S -markiertem Methionin und 2-D Gelelektrophorese konnten von Gerth *et al.* die Enzyme GlmS, IlvB, PurF und PyrB, welche an den ersten Schritten verschiedener Biosynthesewege, wie der Zellwandbiosynthese, der Synthese von verzweigtkettigen Aminosäuren sowie der Biosynthese von Purinen und Pyrimidinen, beteiligt sind, als neue ClpCP-Substrate identifiziert werden (Gerth *et al.*, 2008). Ein weiteres Substrat der ClpCP-Protease von *B. subtilis* ist die UDP-N-Acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase MurAA (entspricht in *L. monocytogenes* MurA [Lmo2526]), welche den ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese katalysiert. Die Akkumulation von MurAA konnte dabei in der Abwesenheit von ClpP in der 2D-Gelelektrophorese und beim Fehlen von ClpC und ClpP in der Immunopräzipitation nach einem Pulse-Chase Experiment mit radioaktiv-markiertem Methionin beobachtet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die ClpCP-abhängige MurAA-Degradation besonders verstärkt beim Übergang in die stationäre Phase auftritt, welches die Einstellung des Wachstums aufgrund fehlender Zellwandvorstufenmoleküle erklärt (Kock *et al.*, 2004). Mit Hilfe von Immunoblot-Experimenten mit Zellextrakten der *mecA*- und der *yphH*- (*mecA*-Paralog) Mutanten wurden diese auf eine Adapterfunktion in der ClpCP-abhängigen Degradation von MurAA getestet. Aufgrund der nicht vorhandenen MurAA-Akkumulation in diesen Mutanten, konnten diese als potenzielle Adaptoren für die Erkennung von MurAA ausgeschlossen werden, sodass bis jetzt unbekannte Adaptoren an diesem Prozess beteiligt sein müssen (Kock *et al.*, 2004).

Neben den Regulatoren und Enzymen verschiedener Biosynthesewege wurden auch Zellteilungsproteine wie FtsZ als Substrat der ClpXP-Protease beschrieben, wodurch die zur

Verfügung stehende Menge an FtsZ-Untereinheiten kontrolliert wird (Weart *et al.*, 2005; Camberg *et al.*, 2009; Dziedzic *et al.*, 2010).

1.3.4 Regulation bakterieller Lebensvorgänge durch Serin/Threonin-Proteinkinasen

Neben der Regulation des Protein-Turnovers stellen auch Kaskaden aus Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen Regulationsmechanismen der Bakterien dar, um auf externe Signale, wie Nährstoffe, Sauerstoff, Licht und osmotischen Druck, zu reagieren und sich an eine verändernde Umwelt anzupassen (Egan *et al.*, 2017). Serin/Threonin-Proteinkinasen (STPKs) und die zugehörigen Phosphatasen wurden lange Zeit als spezifisch für eukaryotische Signaltransduktionsprozesse angesehen. Mitte der 1990er Jahre konnten jedoch viele STPKs in Bakteriengenomen, u.a. auch in pathogenen Organismen, identifiziert werden, welche ähnlich zu denen der eukaryotischen Systeme sind (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991; Dworkin, 2015; Manuse *et al.*, 2016; Egan *et al.*, 2017). Für diese eSTPKs (eukaryotic-like STPKs) konnten Funktionen in der Biofilmbildung, der Stressantwort, der Sporulation, dem Metabolismus, der Pathogenität, der Zellwandbiosynthese und der Zellteilung gezeigt werden. Dabei erfolgt die Regulation durch die Phosphorylierung von Ser/Thr-Aminosäureresten an Schlüsselproteinen, wodurch spezifische Downstream-Effekte, wie veränderte Enzymaktivitäten und modulierte Protein-Protein-Interaktionen, ausgelöst werden (Johnson und Lewis, 2001; Cohen, 2002; Egan *et al.*, 2017). Innerhalb der STPKs der Gram-positiven Organismen gibt es eine hochkonservierte Subfamilie, welche als PASTA (PBP and serine/threonine kinase-associated) domain-containing eSTPKs bezeichnet werden (Jones und Dyson, 2006). Die PASTA-Domänen sind in der Lage Muropeptide sowie das Lipid II-Molekül zu erkennen und zu binden (Shah *et al.*, 2008; Mir *et al.*, 2011; Hardt *et al.*, 2017). Die PASTA-Domänen kommen neben den eSTPKs auch in HMW PBPs vor und sind sowohl an der Bindung von Zellwandvorstufenmoleküle als auch von β -Lactam Antibiotika beteiligt (Gordon *et al.*, 2000; Yeats *et al.*, 2002).

In *Mycobacterium tuberculosis* ist PknB die einzige bekannte PASTA-eSTPK und besteht aus einer konservierten N-terminalen Kinasedomäne, einer Transmembranregion und vier extrazellulären PASTA-Domänen (Jones und Dyson, 2006; Barthe *et al.*, 2010). Für PknB in *M. tuberculosis* wurden verschiedene Substrate aus unterschiedlichen zellulären Prozessen identifiziert (Molle und Kremer, 2010). Ein Beispiel ist die Phosphorylierung von mindestens einem Threonin-Rest in der C-terminalen Domäne von GlmU, einem bifunktionalen Enzym, welches an der Synthese des Peptidoglykanvorstufenmoleküls UDP-*N*-Acetylglucosamin beteiligt ist, wodurch dessen Acetyltransferase-Aktivität moduliert wird (Parikh *et al.*, 2009).

Weiterhin sind MurJ, die essenzielle Flippase für das Lipid II-Molekül in der Peptidoglykanbiosynthese, sowie das Klasse A PBP PonA1, welches für die Polymerisierung des Peptidoglykans verantwortlich ist, Substrate von PknB (Prisic *et al.*, 2010; Gee *et al.*, 2012; Kieser *et al.*, 2015). CwIM, eine Peptidoglykan-Amidase, aktiviert nach erfolgter Phosphorylierung durch PknB allosterisch die UDP-GlcNAc 1-carboxyvinyltransferase MurA, welche an dem ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese beteiligt ist (Boutte *et al.*, 2016). In *S. aureus* konnten für die korrespondierenden Kinase-/Phosphatase- (*stk1/stp1*) Doppelmutanten Defekte in der Zellteilung und der Septenbildung beobachtet werden. Außerdem zeigte die *stk1*-Nullmutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Zellwand-Antibiotika Cephalosporin und Carbapenem (Beltramini *et al.*, 2009). Eine Beeinflussung der Cephalosporin-Resistenz konnte auch in *E. faecalis* von Kristich *et al.* beobachtet werden, wobei die Abwesenheit der Kinase IreK die Empfindlichkeit erhöht und die Deletion der Phosphatase IreP den gegenteiligen Effekt aufweist (Kristich *et al.*, 2011). Eine Zunahme der Resistenz konnte auch in der *E. faecalis ireB*-Deletionsmutante gezeigt werden, wobei IreB ein Substrat der Kinase (IreK) und der Phosphatase (IreP) ist, und durch einen bis zum jetzigen Zeitpunkt unbekannten Mechanismus durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung als negativer Regulator der Cephalosporin-Resistenz fungiert (Hall *et al.*, 2013). In *L. monocytogenes* führt die Depletion der Kinase *prkA* ebenfalls zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen β -Lactam-Antibiotika, wie Ampicillin, Ceftriaxon und Cephalexin (Pensinger *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PrkA das hochkonservierte Protein YvcK, welches eine unbekannte Funktion besitzt, direkt phosphoryliert und beide Proteine wichtig für die Zellwandhomöostase und die Überlebensfähigkeit von *L. monocytogenes* im Wirtszytosol während einer Infektion sind (Pensinger *et al.*, 2016). Für *Streptococcus pneumoniae* konnte die Phosphorylierung von Proteinen der Zellwandbiosynthese, wie MurC (Falk und Weisblum, 2013) und GlmM (Novakova *et al.*, 2005), und den Zellteilungsproteinen FtsA (Beilharz *et al.*, 2012) und FtsZ (Giefing *et al.*, 2010) durch StkP gezeigt werden. Interessanterweise konnten durch die Inaktivierung der PASTA-eSTPK PrkC in *B. subtilis* keine Effekte auf die Zellteilung, die Zellform oder das Wachstum festgestellt werden. Stattdessen wurden Veränderungen der Physiologie in der stationären Phase sowie der Sporenbildung beobachtet (Gaidenko *et al.*, 2002; Shah *et al.*, 2008). Durch die Bestimmung des Phosphoproteoms in *B. subtilis* konnte jedoch gezeigt werden, dass die späten Zellteilungsproteine und Regulatoren DivIVA und GpsB an bestimmten Serin- und Threonin-Aminosäureresten *in vivo* phosphoryliert werden, welches auf einen Zusammenhang zwischen den STPK und der Zellteilung schließen lässt (Macek *et al.*, 2007; Ravikumar *et al.*, 2014; Pompeo *et al.*, 2015). Weitere Untersuchungen zeigten, dass GpsB in

B. subtilis für die Autophosphorylierung von PrkC notwendig ist, und GpsB selbst spezifisch an Thr75 von PrkC phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von GpsB wiederum inhibiert die Autophosphorylierung und die Aktivität von PrkC, sodass die Regulation der PrkC-Aktivität über einen negativen Feedback-Loop erfolgt (Pompeo *et al.*, 2015). Dieses Beispiel der Kontrolle eines Regulationsmechanismus über eine negative Rückkopplung unterstreicht noch einmal die Wichtigkeit der strikten Regulation von zellulären Prozessen.

1.3.5 Die Rolle von GpsB in der Peptidoglykanbiosynthese und der Zellteilung

GpsB ist ein spätes Zellteilungsprotein und ein Paralog des Zellteilungsregulators DivIVA, wobei GpsB ausschließlich in Gram-positiven Bakterien mit einem geringen GC-Gehalt, den *Firmicutes*, vorkommt (Massidda *et al.*, 1998; Claessen *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008). GpsB wurde erstmals in *B. subtilis* charakterisiert, wo beobachtet wurde, dass die gemeinsame Deletion von *gpsB* und *ezrA* (Claessen *et al.*, 2008) und *gpsB* und *ftsA* (Tavares *et al.*, 2008) zu schweren Zellteilungs- und Wachstumsdefekten führte. Weitere Untersuchungen zu GpsB legen eine Gerüstfunktion nahe, bei der das zytosolische GpsB die Interaktionen zwischen anderen Proteinen vermittelt und so die Bildung von größeren Komplexen an bestimmten Orten während des Zellzyklus unterstützt (Cleverley *et al.*, 2019). Zu den Interaktionspartnern von GpsB gehört das bifunktionale Klasse A Penicillin-bindende Protein, mit dem Wechselwirkungen in *B. subtilis* (BsPBP 1), *L. monocytogenes* (LmPBP A1) und *S. pneumoniae* (SpPBP 2a) gezeigt werden konnten (Cleverley *et al.*, 2019). In diesen drei Organismen konnte zudem eine Interaktion von GpsB mit MreC bestätigt werden, welches an der Aufrechterhaltung der Zellform beteiligt ist (Claessen *et al.*, 2008; Rued *et al.*, 2017; Cleverley *et al.*, 2019). In einem Bacterial-Two-Hybrid-Experiment konnten sowohl in *B. subtilis* (Claessen *et al.*, 2008) als auch in *S. pneumoniae* (Rued *et al.*, 2017) Interaktionen zwischen GpsB und dem Negativregulator der FtsZ-Polymerisierung EzrA beobachtet werden. Darüber hinaus ist GpsB an der Regulation der Kinase-Aktivität der PASTA-eSTPK PrkC in *B. subtilis* und der entsprechenden Kinase in *S. pneumoniae* (StkP) beteiligt, wo GpsB neben der Aktivität auch die Lokalisierung von StkP am Septum beeinflusst (Fleurie *et al.*, 2014; Pompeo *et al.*, 2015). In *L. monocytogenes* konnten weiterhin Interaktionen von GpsB und SepF gezeigt werden, sowie eine Interaktion von GpsB und FtsZ in *S. aureus* (Eswara *et al.*, 2018; Cleverley *et al.*, 2019). Diese Interaktionen sowie die Lokalisierung von GpsB am Teilungsseptum und der lateralen Zellwand, welche sowohl in *B. subtilis*, *L. monocytogenes* und *S. pneumoniae* beobachtet werden konnte, legen einen Zusammenhang von GpsB und der Zellteilung nahe (Claessen *et al.*, 2008; Land *et al.*, 2013;

Fleurie *et al.*, 2014; Rismondo *et al.*, 2016). Die Vermittlung von Interaktionen und die potenzielle Bindung von mehr als einem Interaktionspartner wird durch die Struktur von GpsB ermöglicht (Cleverley *et al.*, 2019). Die DivIVA/GpsB-Proteine bestehen aus einer hochkonservierten N-terminalen Domäne (NTD), die über eine Linker-Region mit einer C-terminalen Domäne (CTD) verbunden ist, wobei sich die CTD von DivIVA und GpsB deutlich in der Länge und der Sequenz unterscheidet (Halbedel und Lewis, 2019). Auch das Auftreten von einem oder mehreren Prolinresten in der Linker-Region konnte nur für GpsB-Proteine beobachtet werden (Claessen *et al.*, 2008). Aufgrund der Fähigkeit von DivIVA Phospholipidvesikel mit Hilfe der NTD zu binden, wird diese auch als Lipidbinde-Domäne (LBD) bezeichnet (Lenarcic *et al.*, 2009; Ramamurthi und Losick, 2009). Interaktionen mit der Membran konnten auch für die NTD von *LmGpsB* beobachtet werden. Die GpsB NTD/LBD ist ein Coiled-coil Dimer, wobei sich die einzelnen Helices an der Spitze des Moleküls kreuzen und dann wieder in eine Dimer-Struktur übergehen (Rismondo *et al.*, 2016). Die CTD bildet ein Bündel aus drei parallelen Helices. Dementsprechend ist GpsB ein Dreifuß-ähnliches Hexamer, wobei die Basis aus zwei interagierenden C-terminalen Domänen (jeweils ein Trimer) besteht und drei N-terminale Domänen (jeweils ein Dimer) die Füße bilden (Rismondo *et al.*, 2016; Cleverley *et al.*, 2016). Die Destabilisierung der Hexamerbildung durch das Einbringen von Mutationen resultierte in einem Δ *gpsB*-Phänotyp, sodass die Oligomerisierung essenziell für die korrekte Funktion von GpsB zu sein scheint (Cleverley *et al.*, 2016). Die Bindung an die Zytoplasmamembran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen der Oberflächen-exponierten Aminosäureseitenketten der NTD (Rismondo *et al.*, 2016). Innerhalb der NTD befindet sich zusätzlich eine Vertiefung an der Oberfläche, welcher aus einer Reihe von konservierten, meist negativ-geladenen Aminosäureresten gebildet wird (Rismondo *et al.*, 2016). Mit Hilfe eines Bacterial-Two-Hybrid-Experiments konnte gezeigt werden, dass diese konservierten Aminosäuren (Y27, D33, D37 und I40) der NTD für eine Interaktion mit *LmPBPA1* essenziell sind (Rismondo *et al.*, 2016). Innerhalb einer NTD befinden sich zwei PBP A1-Bindestellen, sodass in einem GpsB-Hexamer insgesamt sechs dieser PBP A1-Bindestellen vorliegen. Aufgrund dessen wird vermutet, dass GpsB die Bildung von PBP A1-Clustern begünstigt oder die Interaktion von PBP A1 mit anderen Proteinen vermittelt (Rismondo *et al.*, 2016).

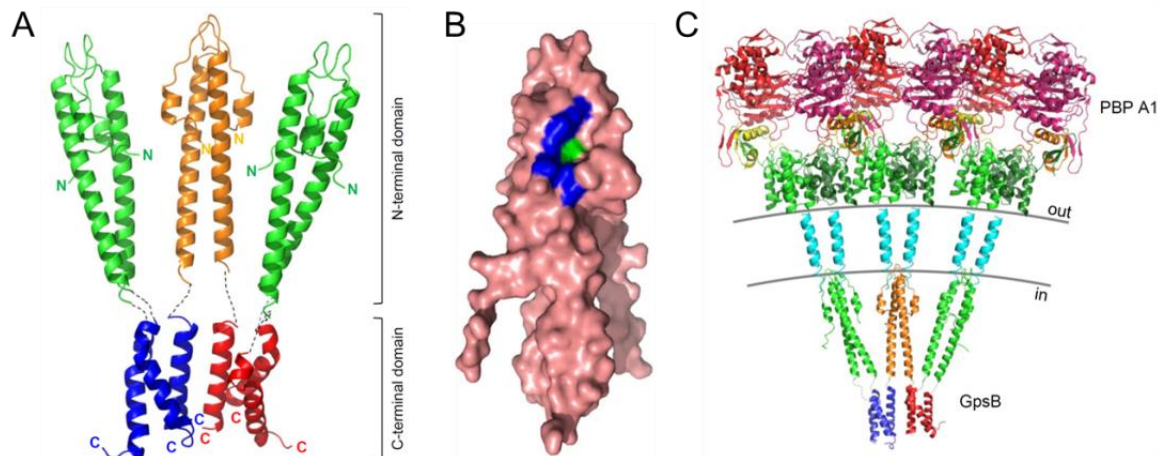


Abbildung 4: Die Struktur von GpsB und die Interaktion mit PBP A1. (A) GpsB besteht aus einer hochkonservierten N-terminalen Domäne, welche über eine Linker-Region mit der C-terminalen Domäne verbunden ist. Die GpsB-Monomere lagern sich zu einem Dreifuß-ähnlichen Hexamer zusammen, wobei die Basis aus zwei interagierenden C-terminalen Domänen (jeweils ein Trimer) besteht und drei N-terminale Domänen (jeweils ein Dimer) die Füße bilden (Cleverley *et al.*, 2016). (B) Darstellung der Oberfläche von GpsB₁₋₇₃. Die blaue Markierung zeigt die Aminosäuren, welche wichtig für die Bindung von PBP A1 sind (Y27, D33, D37, I40) (Rismondo *et al.*, 2016). (C) Darstellung der Interaktion von GpsB mit PBP A1. Innerhalb einer GpsB-NTD befinden sich zwei PBP A1-Bindestellen, sodass in einem GpsB-Hexamer sechs PBP A1-Moleküle gebunden werden können (Cleverley *et al.*, 2019).

Mit Hilfe einer *gpsB*-Deletionsmutante wurde die Funktion von GpsB in *L. monocytogenes* von Rismondo *et al.* genauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Deletion von *gpsB* zu einer erhöhten Lyse der Zellen, Zellteilungs- und Wachstumsdefekten, und einer verminderten Virulenz führt (Rismondo *et al.*, 2016). Der Wachstumsdefekt der Δ *gpsB*-Mutante äußert sich bei 37°C in einer verminderten Wachstumsrate, wohingegen bei 42°C kein Wachstum möglich ist (Rismondo *et al.*, 2016). Durch die Deletion von *pbpA1* im Δ *gpsB*-Hintergrund konnte dieser Wachstumsdefekt partiell supprimiert werden. Dadurch wurde vermutet, dass die Aktivität von PBP A1 in der Abwesenheit von GpsB fehlreguliert ist und GpsB somit als Negativregulator von PBP A1 fungiert (Rismondo *et al.*, 2016). Außerdem wurde beobachtet, dass das zweite bifunktionale PBP, PBP A2, in der Δ *gpsB*-Mutante essenziell ist (Rismondo *et al.*, 2016). Da bereits zuvor beschrieben wurde, dass in *L. monocytogenes* mindestens eins der Klasse A PBPs für das Wachstum benötigt wird (Rismondo *et al.*, 2015), scheint GpsB für eine korrekte PBP A1-Aktivität notwendig zu sein (Rismondo *et al.*, 2016).

Von Rismondo *et al.* wurde weiterhin gezeigt, dass sich beim Ausstreichen der *L. monocytogenes* Δ *gpsB*-Mutante auf BHI-Agarplatten und anschließender Inkubation bei 42°C spontane Suppressoren bilden (Rismondo *et al.*, 2017). Diese wurden isoliert und ihre Genome

sequenziert. Dadurch konnten *gpsB*-Suppressormutationen in den Genen *clpC* und *murZ* nachgewiesen werden (Rismondo *et al.*, 2017). Wie bereits beschrieben handelt es sich bei *clpC* um die ATPase-Untereinheit der ClpCP-Protease, welche an der Proteindegradation infolge der Hitze-Stress-Antwort beteiligt ist (Rouquette *et al.*, 1996; Moliere und Turgay, 2009). MurZ ist neben MurA eine der zwei UDP-GlcNAc 1-carboxyvinyltransferasen in *L. monocytogenes*, welche den ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese katalysieren (Barreteau *et al.*, 2008). Sowohl die Deletion von *clpC* als auch die Deletion von *murZ* im Δ *gpsB*-Hintergrund supprimieren den Wachstumsdefekt bei 42°C. Außerdem kommt es in den Δ *clpC*- und Δ *murZ*-Einzelmutanten sowie den jeweiligen Δ *gpsB*-Doppelmutanten zu einer Akkumulation von MurA (Rismondo *et al.*, 2017). In *B. subtilis* wurde gezeigt, dass MurAA ein Substrat der ClpCP-Protease ist (Kock *et al.*, 2004). Die beobachtete Akkumulation von MurA in der Δ *clpC*-Mutante, legt nahe, dass die Degradation von MurA auch in *L. monocytogenes* durch die ClpCP-Protease erfolgt (Rismondo *et al.*, 2017). Eine artifizielle Überexpression von MurA ermöglicht das Wachstum der Δ *gpsB*-Mutante bei 42°C, sodass eine erhöhte MurA-Menge ausreichend für die Korrektur des Wachstumsdefekts der Δ *gpsB*-Mutante ist (Rismondo *et al.*, 2017). Eine Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps konnte auch durch die Inaktivierung von Genen beobachtet werden, die das Vorstufenmolekül der Peptidoglykanbiosynthese UDP-GlcNAc für andere Stoffwechselwege verwenden, da auch die Deletion von *gtcA* und *Imo2550*, welche an der Ausstattung der Wandteichonsäuren mit GlcNAc-Resten beteiligt sind, zur Aufhebung des Wachstumsdefekts der Δ *gpsB*-Mutante bei 42°C führte (Promadej *et al.*, 1999; Eugster *et al.*, 2011; Rismondo *et al.*, 2017). Diese Beobachtungen legen ein Modell nahe, bei dem die Fehlregulation von PBP A1 in der Abwesenheit von GpsB zu einem ineffizienten Einbau von Zellwandvorstufenmolekülen in die Zellwand führt und somit durch eine gestörte Peptidoglykanbiosynthese den Wachstumsdefekt der Δ *gpsB*-Mutante bewirkt. Diese Auswirkungen der PBP A1-Fehlregulation können entweder direkt durch die Inaktivierung von PBP A1 kompensiert werden oder durch die Stimulation der Peptidoglykanbiosynthese durch erhöhte MurA-Mengen (durch die Deletion von *clpC* und *murZ*) oder durch die Erhöhung der Zufuhr des Vorstufenmoleküls UDP-GlcNAc (durch die Deletion von *gtcA* und *Imo2550*) (Rismondo *et al.*, 2017).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Neben den bereits beschriebenen *gpsB*-Suppressorgenen in *L. monocytogenes* (*clpC*, *murZ*, *gtcA* und *lmo2550*) konnten innerhalb des ersten Suppressorscreens noch drei weitere Suppressorgene ermittelt werden. Bei diesen Genen handelt es sich um *lmo1503*, *lmo1549* und *lmo1921*. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte keinem dieser Gene eine bestimmte Funktion zugeordnet werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung dieser Gene und die Aufklärung des Mechanismus der Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps. Dazu wurden verschiedene Deletionsstämme generiert und diese auf ihre Morphologie, das Wachstumsverhalten bei verschiedenen Stressoren (Antibiotika, Salz, Hitze) und die Akkumulation von MurA getestet. Durch verschiedene Methoden sollten weiterhin genetische und physikalische Interaktionspartner der Suppressorgene identifiziert werden. Durch die Ermittlung der Kristallstruktur von *Lmo1503* konnten strukturbasierte Ansätze genutzt werden, um die Funktion von *Lmo1503* weiter aufzuklären.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 1 und Tabelle 2 werden die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide aufgelistet. Für die Generierung der Mutanten in *L. monocytogenes* wurde der Wildtypstamm EGD-e (Serovar 1/2a) verwendet. Die *B. subtilis*-Mutanten wurden über die BKE Genome-Scale Deletion Library (Koo *et al.*, 2017) bezogen. Als Wirtsorganismus für die konstruierten Plasmide wurde *E. coli* Top10 (Sambrook *et al.*, 1989) genutzt.

Tabelle 1: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz/Konstruktion
pET11a	<i>bla</i> P _{T7} <i>lacI</i>	Novagen
pIMK2	P _{help} <i>neo</i>	(Monk <i>et al.</i> , 2008)
pIMK3	P _{help} - <i>lacO lacI neo</i>	(Monk <i>et al.</i> , 2008)
pMAD	<i>bla erm bgaB</i>	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pUT18	<i>bla</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T18)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18c	<i>bla</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T18)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pKT25	<i>kan</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T25)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
p25-N	<i>kan</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T25)	(Claessen <i>et al.</i> , 2008)
pSH186	<i>bla erm bgaB ΔdivIVA</i> (Imo2020)	(Halbedel <i>et al.</i> , 2012)
pSH226	<i>bla</i> P _{lac} - <i>gpsB-cya</i> (T18)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2016)
pSH227	<i>bla</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T18)- <i>gpsB</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2016)
pSH228	<i>kan</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T25)- <i>gpsB</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2016)
pSH229	<i>kan</i> P _{lac} - <i>gpsB-cya</i> (T25)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2016)
pSH254	P _{help} - <i>lacO-gpsB lacI neo</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2016)
pSH378	<i>bla erm bgaB ΔminCD</i> (Imo1544-1545)	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
pSH379	<i>bla erm bgaB ΔminJ</i> (Imo2502)	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
pSH392	<i>bla erm bgaB ΔminC</i> (Imo1545)	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
pSH475	<i>bla erm bgaB ΔImo2550-gtcA</i> (Imo2549)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2017)
pJR53	<i>bla erm bgaB ΔImo1892</i> (<i>pbpA</i> 1)	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR65	P _{help} - <i>lacO-reoM lacI neo</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR68	<i>bla erm bgaB ΔmurZ</i> (Imo2552)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2017)
pJR69	P _{help} - <i>lacO-Imo1549 lacI neo</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR83	<i>bla erm bgaB ΔreoY</i> (Imo1921)	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR84	<i>bla erm bgaB ΔImo1549</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht

pJR101	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-reoM (lmo1503)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR102	<i>kan P_{lac}-reoM-cya(T25)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR103	<i>bla P_{lac}-reoM-cya(T18)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR104	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-reoM</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR105	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-lmo1549</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR106	<i>kan P_{lac}-lmo1549-cya(T25)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR107	<i>bla P_{lac}-lmo1549-cya(T18)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR108	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-lmo1549</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR109	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-reoY</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR110	<i>kan P_{lac}-reoY-cya(T25)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR111	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-reoY</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR116	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-murA</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR117	<i>kan P_{lac}-murA-cya(T25)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR118	<i>bla P_{lac}-murA-cya(T18)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR119	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-murA</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR121	<i>bla P_{lac}-reoY-cya(T18)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR126	<i>bla erm bgaB ΔreoM</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR127	<i>bla erm bgaB ΔclpC (lmo0232)</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2017)
pJR149	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-minC</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR150	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-minD</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR151	<i>kan P_{lac}-minD-cya(T25)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR152	<i>bla P_{lac}-minC-cya(T18)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR153	<i>bla P_{lac}-minD-cya(T18)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR154	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-minC</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR155	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-minD</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR156	<i>kan P_{lac}-minC-cya(T25)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR161	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-lmo1549¹⁻¹⁰⁰</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR162	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-lmo1549¹⁰⁰⁻²²⁴</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR166	<i>kan P_{lac}-lmo1549¹⁻¹⁰⁰-cya(T25)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR167	<i>kan P_{lac}-lmo1549¹⁰⁰⁻²²⁴-cya(T25)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR175	<i>bla P_{lac}-lmo1549¹⁻¹⁰⁰-cya(T18)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR176	<i>bla P_{lac}-lmo1549¹⁰⁰⁻²²⁴-cya(T18)</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR180	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-lmo1549¹⁻¹⁰⁰</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pJR181	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-lmo1549¹⁰⁰⁻²²⁴</i>	Jeanine Rismondo, unveröffentlicht
pKK25	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-minJ</i>	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
pKK26	<i>bla P_{lac}-minJ-cya(T18)</i>	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
pKK32	<i>kan P_{lac}-minJ-cya(T25)</i>	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)

pKK33	<i>bla</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T18)- <i>minJ</i>	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
pLR7	P _{help} - <i>lacO</i> - <i>msfgfp</i> - <i>zapA</i> <i>lacI</i> <i>neo</i>	Subklonierung von <i>zapA</i> aus pLR5 über NcoI/ClaI (Masterarbeit, Lisa Rosemeyer)
pLR9	<i>bla</i> <i>erm</i> <i>bgaB</i> Δ <i>sepF</i> (<i>Imo2030</i>)	Fusion von <i>sepF</i> upstream (LR13/LR15) und <i>sepF</i> downstream (LR14/LR16) Restriktions-frei in pMAD
pLR10	<i>bla</i> <i>erm</i> <i>bgaB</i> Δ <i>zapA</i> (<i>Imo1229</i>)	Fusion von <i>zapA</i> upstream (LR17/LR19) und <i>zapA</i> downstream (LR18/LR20) Restriktions-frei in pMAD
pSW16	<i>bla</i> <i>erm</i> <i>bgaB</i> Δ <i>mreB</i> (<i>Imo1548</i>)	Fusion <i>mreB</i> upstream (SHW41/SHW42) und <i>mreB</i> downstream (SHW43/SHW44) über BamHI/NcoI in pMAD
pSW21	<i>bla</i> <i>erm</i> <i>bgaB</i> Δ <i>mreB</i>	Versetzung Startcodon mit SW51/SW52 in pSW16
pSW25	P _{help} - <i>lacO</i> - <i>mreB</i> <i>lacI</i> <i>neo</i>	<i>mreB</i> (SW53/SW54) über NcoI/Sall in pIMK3
pSW29	P _{help} - <i>lacO</i> - <i>reoM</i> T7A <i>lacI</i> <i>neo</i>	T7A mit SW77/SW78 in pJR65
pSW30	P _{help} - <i>lacO</i> - <i>reoM</i> T7D <i>lacI</i> <i>neo</i>	T7D mit SW79/SW80 in pJR65
pSW36	<i>bla</i> <i>erm</i> <i>bgaB</i> Δ <i>prkA</i> (<i>Imo1820</i>)	Fusion <i>Imo1820</i> upstream (SHW819/SHW821) und <i>Imo1820</i> downstream (SHW820/SHW822) über SOE-PCR in pMAD
pSW37	<i>bla</i> <i>erm</i> <i>bgaB</i> Δ <i>prpC</i> (<i>Imo1821</i>)	Fusion <i>Imo1821</i> upstream (SHW815/SHW817) und <i>Imo1821</i> downstream (SHW816/SHW818) über SOE-PCR in pMAD
pSW38	P _{help} - <i>lacO</i> - <i>prkA</i> <i>lacI</i> <i>neo</i>	<i>prkA</i> (SW112/113) über Sall/BamHI in pIMK3
pSW39	P _{help} - <i>lacO</i> - <i>prpC</i> <i>lacI</i> <i>neo</i>	<i>prpC</i> (SW110/111) über Sall/BamHI in pIMK3
pSW43	<i>kan</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T25)- <i>clpC</i>	<i>clpC</i> (SHW830/831) über KpnI/XbaI in pKT25
pSW44	<i>kan</i> P _{lac} - <i>cya</i> (T25)- <i>clpP</i>	<i>clpP</i> (SHW832/833) über KpnI/XbaI in pKT25
pSW45	<i>kan</i> P _{lac} - <i>clpC</i> - <i>cya</i> (T25)	<i>clpC</i> (SHW830/831) über KpnI/XbaI in p25-N
pSW46	<i>kan</i> P _{lac} - <i>clpP</i> - <i>cya</i> (T25)	<i>clpP</i> (SHW832/833) über KpnI/XbaI in

		p25-N
pSW47	<i>bla P_{lac}-clpC-cya(T18)</i>	<i>clpC</i> (SHW830/831) über KpnI/XbaI in pUT18
pSW48	<i>bla P_{lac}-clpP-cya(T18)</i>	<i>clpP</i> (SHW832/833) über KpnI/XbaI in pUT18
pSW49	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-clpC</i>	<i>clpC</i> (SHW830/831) über KpnI/XbaI in pUT18c
pSW50	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-clpP</i>	<i>clpP</i> (SHW832/833) über KpnI/XbaI in pUT18c
pSW55	<i>P_{help}-lacO-reoM R66A lacI neo</i>	R66A mit SW136/SW137 in pJR65
pSW56	<i>P_{help}-lacO-reoM R70A lacI neo</i>	R70A mit SW138/SW139 in pJR65
pSW58	<i>P_{help}-lacO-reoM R57A lacI neo</i>	R57A mit SW144/SW145 in pJR65
pSW59	<i>P_{help}-lacO-reoM R62A lacI neo</i>	R62A mit SW146/SW147 in pJR65

Tabelle 2: Verwendete *L. monocytogenes*- und *B. subtilis*-Stämme

Name	Genotyp	Referenz/Konstruktion
<u><i>L. monocytogenes</i></u>		
EGD-e	Wildtypstamm, Serovar 1/2a	(Glaser <i>et al.</i> , 2001)
LMS2	Δ divIVA (<i>Imo2020</i>)	(Halbedel <i>et al.</i> , 2012)
LMS56	Δ gpsB attB::P _{help} -lacO-gpsB lacI neo	(Rismondo <i>et al.</i> , 2016)
LMS57	Δ pbpA1 (<i>Imo1892</i>)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015)
LMS64	Δ pbpA2 (<i>Imo2229</i>)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015)
LMS120	Δ minJ (<i>Imo2502</i>)	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
LMS148	Δ minC (<i>Imo1545</i>)	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
LMS201	Δ Imo2550-gtcA (<i>Imo2549</i>)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2017)
LMJR19	Δ gpsB (<i>Imo1888</i>)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2016)
LMJR104	Δ murZ (<i>Imo2552</i>)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2017)
LMJR116	attB::P _{help} -lacO-murA lacI neo	(Rismondo <i>et al.</i> , 2017)
LMJR119	Δ gpsB Δ Imo1549	pJR84 ↔ LMJR19
LMJR123	Δ murA (<i>Imo2526</i>) attB::P _{help} -lacO-murA lacI neo	(Rismondo <i>et al.</i> , 2017)
LMJR120	Δ gpsB Δ reoY (<i>Imo1921</i>)	pJR83 ↔ LMJR19
LMJR137	Δ gpsB Δ reoM (<i>Imo1503</i>)	pJR126 ↔ LMJR19
LMJR138	Δ clpC (<i>Imo0232</i>)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2017)
LMJR139	Δ clpC Δ gpsB	pJR127 ↔ LMJR19
LMJR171	Δ clpC Δ murZ	pJR127 ↔ LMJR104

LMKK35	$\Delta minCD$ (<i>lmo1544-1545</i>)	(Kaval <i>et al.</i> , 2014)
LMLR6	<i>attB::P_{help}-lacO-msfgfp-zapA lacI neo</i>	pLR7 \leftrightarrow EGD-e
LMLR8	$\Delta sepF$ (<i>lmo2030</i>)	pLR9 \leftrightarrow EGD-e
LMLR9	$\Delta zapA$ (<i>lmo1229</i>)	pLR10 \leftrightarrow EGD-e
LMSW18	$\Delta lmo1549$	pJR84 \leftrightarrow EGD-e
LMSW30	$\Delta reoM$	pJR126 \leftrightarrow EGD-e
LMSW32	$\Delta reoY$	pJR83 \leftrightarrow EGD-e
LMSW35	$\Delta lmo1549 \Delta pbpA2$	pJR84 \leftrightarrow LMS64
LMSW36	$\Delta lmo1549 \Delta pbpA1$	pJR53 \leftrightarrow LMSW18
LMSW37	$\Delta lmo1549 \Delta divIVA$	pSH186 \leftrightarrow LMSW18
LMSW38	$\Delta lmo1549 \Delta lmo2550-gtcA$	pSH475 \leftrightarrow LMSW18
LMSW41	$\Delta gpsB \Delta lmo1549 \Delta lmo2550-gtcA$	pSH475 \leftrightarrow LMJR119
LMSW44	<i>attB::P_{help}-lacO-mreB lacI neo</i>	pSW25 \rightarrow EGD-e
LMSW49	$\Delta mreB$ <i>attB::P_{help}-lacO-mreB lacI neo</i>	pSW21 \leftrightarrow LMSW44
LMSW50	$\Delta clpC \Delta reoM$	pJR126 \leftrightarrow LMJR138
LMSW51	$\Delta clpC \Delta reoY$	pJR83 \leftrightarrow LMJR138
LMSW52	$\Delta reoM$ <i>attB::P_{help}-lacO-reoM T7A lacI neo</i>	pSW29 \rightarrow LMSW30
LMSW53	$\Delta reoM$ <i>attB::P_{help}-lacO-reoM T7D lacI neo</i>	pSW30 \rightarrow LMSW30
LMSW54	<i>attB::P_{help}-lacO-msfgfp-zapA lacI neo</i> $\Delta gpsB \Delta lmo1549$	pLR7 \rightarrow LMJR119
LMSW55	<i>attB::P_{help}-lacO-msfgfp-zapA lacI neo</i> $\Delta lmo1549$	pLR7 \rightarrow LMSW18
LMSW56	<i>attB::P_{help}-lacO-msfgfp-zapA lacI neo</i> $\Delta gpsB$	pLR7 \rightarrow LMJR19
LMSW57	$\Delta reoM$ <i>attB::P_{help}-lacO-reoM lacI neo</i>	pJR65 \rightarrow LMSW30
LMSW58	$\Delta lmo1549 \Delta zapA$	pLR10 \leftrightarrow LMSW18
LMSW59	$\Delta lmo1549 \Delta sepF$	pLR9 \leftrightarrow LMSW18
LMSW60	$\Delta lmo1549 \Delta gpsB$ <i>attB::P_{help}-lacO-gpsB lacI neo</i>	pSH254 \rightarrow LMJR119
LMSW65	$\Delta lmo1549 \Delta minCD$	pSH378 \rightarrow LMSW18
LMSW66	$\Delta lmo1549 \Delta gpsB$ <i>attB::P_{help}-lacO-lmo1549 lacI neo</i>	pJR69 \rightarrow LMJR119
LMSW68	$\Delta lmo1549 \Delta minC$	pSH392 \leftrightarrow LMSW18
LMSW69	$\Delta lmo1549 \Delta minJ$	pSH379 \leftrightarrow LMSW18
LMSW74	$\Delta reoM \Delta clpC$ <i>attB::P_{help}-lacO-reoM T7A lacI neo</i>	pSW29 \rightarrow LMSW50
LMSW75	$\Delta reoM \Delta clpC$ <i>attB::P_{help}-lacO-reoM T7D lacI neo</i>	pSW30 \rightarrow LMSW50
LMSW76	$\Delta prpC$ <i>prkA*</i>	pSW37 \leftrightarrow EGD-e
LMSW80	<i>attB::P_{help}-lacO-prkA lacI neo</i>	pSW38 \rightarrow EGD-e
LMSW81	<i>attB::P_{help}-lacO-prpC lacI neo</i>	pSW39 \rightarrow EGD-e
LMSW83	$\Delta prpC$ <i>attB::P_{help}-lacO-prpC lacI neo</i>	pSW37 \leftrightarrow LMSW81
LMSW84	$\Delta prkA$ <i>attB::P_{help}-lacO-prkA lacI neo</i>	pSW36 \leftrightarrow LMSW80
LMSW85	$\Delta gpsB \Delta minJ$	pSH379 \leftrightarrow LMJR19

LMSW86	$\Delta gpsB \Delta minCD$	pSH378 ↔ LMJR19
LMSW89	$\Delta prkA attB::P_{help}-lacO-prkA lacI neo \Delta reoM$	pJR126 ↔ LMSW84
LMSW90	$\Delta prkA attB::P_{help}-lacO-prkA lacI neo \Delta reoY$	pJR83 ↔ LMSW84
LMSW91	$\Delta prkA attB::P_{help}-lacO-prkA lacI neo \Delta clpC$	pJR127 ↔ LMSW84
LMSW117	$\Delta reoM \Delta reoY$	pJR126 ↔ LMSW32
LMSW118	$\Delta murZ \Delta reoY$	pJR68 ↔ LMSW32
LMSW119	$\Delta murZ \Delta reoM$	pJR68 ↔ LMSW30
LMSW120	$\Delta reoM attB::P_{help}-lacO-reoM R66A lacI neo$	pSW55 → LMSW30
LMSW121	$\Delta reoM attB::P_{help}-lacO-reoM R70A lacI neo$	pSW56 → LMSW30
LMSW123	$\Delta reoM attB::P_{help}-lacO-reoM T7A lacI neo \Delta reoY$	pSW29 → LMSW117
LMSW124	$\Delta reoM attB::P_{help}-lacO-reoM T7A lacI neo \Delta murZ$	pSW29 → LMSW119
LMSW125	$\Delta reoM attB::P_{help}-lacO-reoM R57A lacI neo$	pSW58 → LMSW30
LMSW126	$\Delta reoM attB::P_{help}-lacO-reoM T62A lacI neo$	pSW59 → LMSW30
LMSW132	$\Delta minJ attB::P_{help}-lacO- gpsB lacI neo$	pSH379 → LMS56
LMSW133	$\Delta minCD attB::P_{help}-lacO-gpsB lacI neo$	pSH378 → LMS56
LMSW135	$\Delta prpC \Delta gpsB$	pSW37 → LMJR19
LMSW151	$\Delta gpsB \Delta minCD lmo1084 S101I$	diese Arbeit
LMSW152	$\Delta gpsB \Delta minCD murF V46A clpC^{1-450}$	diese Arbeit
LMSW153	$\Delta gpsB \Delta minCD clpC^{1-611}$	diese Arbeit
LMSW154	$\Delta gpsB \Delta minCD fruB G57V$	diese Arbeit
shg5	$\Delta gpsB clpC R762S lmo1549 L44S$	Jeanine Rismondo
shg8	$\Delta gpsB lmo1921 H87Y$	Jeanine Rismondo
shg10	$\Delta gpsB lmo1921^{11-74}$	Jeanine Rismondo
shg12	$\Delta gpsB lmo1503^{RBS}$	Jeanine Rismondo
shg19	$\Delta gpsB murA S262L$	diese Arbeit
shg21	$\Delta gpsB murA N197D$	diese Arbeit
shg55	$\Delta gpsB prpC^{1-44} EWRKWLFFVY-Stop$	diese Arbeit
<u><i>B. subtilis</i></u>		
168	Wildtyp	
BKE00860	$\Delta clpC$	Koo <i>et al.</i> , 2017
BKE22180	$\Delta gpsB$	Koo <i>et al.</i> , 2017
BKE22580	$\Delta ypiB (reoY)$	Koo <i>et al.</i> , 2017
BKE27400	$\Delta yrzL (reoM)$	Koo <i>et al.</i> , 2017

Ein einfacher Pfeil (→) symbolisiert die Integration eines Plasmids an den tRNA^{Arg} Locus in *L. monocytogenes*, der Doppelpfeil (↔) steht für eine Marker-freie Gendeletion (pMAD-Deletionssystem).

2.2 Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien und Medienzusätze

Zur Herstellung der Medien, Puffer und Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Die fertigen Lösungen wurden anschließend autoklaviert (121°C, 2 bar, 20 min) oder beim Beinhalt von hitzeempfindlichen Substanzen mit Steritop-GV-Filtern (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert. Weitere Medienzusätze wurden mit Spritzenvorsatzfiltern (Sartorius) mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert und in den in Tabelle 3 zusammengefassten Konzentrationen eingesetzt.

Tabelle 3: Medienzusätze und verwendete Konzentrationen

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration		
		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. subtilis</i>
Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O	100 µg/ml	-	-
Erythromycin	5 mg/ml in Ethanol	300 µg/ml	5 µg/ml	1 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in ddH ₂ O	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
IPTG	1 M in ddH ₂ O	1 mM	1 mM	-
X-Gal	50 mg/ml in DMSO	100 µg/ml	100 µg/ml	-
Xylose	25 % in ddH ₂ O	-	-	5 %

2.2.2 Kultivierung von *E. coli* und *B. subtilis*

Die *E. coli*- und *B. subtilis*-Stämme wurden in Luria Bertani (LB)-Medium bei 37°C und 250 rpm im Rotationsschüttler (Innova TM43, New Brunswick Scientific) inkubiert. Bei Bedarf wurde das Medium mit den entsprechenden Antibiotika zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks supplementiert. Zur Lagerung wurden die Bakterienkulturen mit 50% Glycerin in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium:	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	ddH ₂ O	ad. 1 l
LB-Agar:	Agar	10 g
	LB-Medium	ad. 1 l

2.2.3 Kultivierung von *L. monocytogenes*

Die *L. monocytogenes*-Stämme wurden in Brain Heart Infusion (BHI)-Medium bei 37°C und 250 rpm angezogen. Die Kultivierung erfolgte unter Zugabe von Antibiotika oder anderen Medienzusätzen sofern erforderlich. Zur Aufbewahrung der Stämme wurden Glycerinkulturen (Endkonzentration 25% v/v) hergestellt und bei -80°C gelagert.

BHI-Medium:	BHI Bouillon (Oxoid)	37 g
	ddH ₂ O	ad. 1 l
BHI-Agar:	Agar	10 g
	BHI Medium	ad. 1 l

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN GmbH). Dazu wurden die *E. coli* TOP10-Stämme in einer 4 ml Übernachtskultur in Selektivmedium angezogen und die Zellen durch Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5415 R) bei 2.300 x g für 5 min geerntet. Die Reinigung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei zur Elution der Plasmid-DNA von der Säule ddH₂O verwendet wurde. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2 Isolation chromosomaler DNA von *L. monocytogenes* und *B. subtilis*

Die chromosomale DNA von *L. monocytogenes* und *B. subtilis* wurde aus einer Übernachtskultur der jeweiligen Stämme gewonnen. Diese wurde bei 37°C und 250 rpm inkubiert und 1 ml der Zellsuspension wurde durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 2.300 x g geerntet. Das Zellpellet wurde in 400 µl TES-Puffer aufgenommen und mit 40 µl Lysozym (Stammlösung: 100 mg/ml) versetzt. Der Ansatz wurde für 40 min (*L. monocytogenes*) bzw. 10 min (*B. subtilis*) bei 37°C inkubiert und die Zellen anschließend durch Zugabe von 40 µl einer 20%igen SDS-Lösung lysiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben mit 400 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt und anschließend 4 min bei 16.100 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform wurde erneut gemischt und die Phasen durch Zentrifugation bei 16.100 x g für 4 min getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 96%igem Ethanol präzipitiert und durch anschließende

Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das trockene DNA-Pellet wurde in 150 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Zur Gewinnung von chromosomaler DNA für die Kolonie-PCR wurde 1 ml einer Übernachtskultur durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 2.300 x g in einem 2 ml Reaktionsgefäß geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend in ddH₂O aufgenommen und 0,2 g Glaskügelchen (Durchmesser 0,1 mm, Roth) hinzugegeben. Im Tissue Lyser II (Quiagen®, 5 min, Frequenz 30/s) wurden die Zellen aufgeschlossen und anschließend die wässrige Lösung durch 5-minütige Zentrifugation bei 16.100 x g von den Glaskügelchen und den Zelltrümmern getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und unmittelbar für die PCR eingesetzt.

TES-Puffer:	1 M EDTA pH7,5	1 ml
	20% SDS	5 ml
	1 M Tris-HCl pH7,5	10 ml
	ddH ₂ O	ad. 1 l
TE-Puffer:	0,5 M EDTA pH8,0	0,2 ml
	1 M Tris-HCl pH8,0	1 ml
	ddH ₂ O	ad. 100 ml

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden Elektrophoresekammern von BioRad oder VWR (Gelkammer (Mini) SubCell GT, BioRad Laboratories GmbH) mit 1 x TAE-Puffer als Elektrodenpuffer verwendet. Zur Herstellung von 1%igen Agarosegelen (w/v) wurde die Agarose (peqLab) in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und in den Gießstand gegossen und mit einem Gelkamm versehen.

Vor dem Beladen der Gele wurden die Proben mit dem 0,2-fachen Volumen 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Zur Ermittlung der Größe der DNA-Fragmente wurde der Größenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter (Thermo Scientific) verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100-120 V (PowerPac™ Basic, BioRad) für 40-60 min. Das Agarose-Gel wurde anschließend mindestens 10 min mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA-Fragmente im Gel mit Hilfe des Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BioRad) und der Analyse-Software Image Lab 6.0 dokumentiert.

6 x DNA-Ladepuffer	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
	Glycerin	30%
50 x TAE-Puffer	0,5 M EDTA pH8,0	100 ml
	Eisessig	57,1 ml
	Tris-Base	242 g
	ddH ₂ O	ad. 1 l
Ethidiumbromid-Bad	0,5% Ethidiumbromid	100 µl
	ddH ₂ O	ad. 1 l

2.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Nanophotometer von Implen bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die ermittelte DNA-Konzentration der Probe sowie das A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis wurden automatisch vom Gerät ausgegeben.

2.3.5 Restriktionsverdau

Die Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in einem 10 µl Ansatz für analytische Zwecke und in einem 60 µl Ansatz zur Präparation von DNA-Fragmenten. Die Ansätze wurden für 1 h bzw. 3-4 h bei der für die Enzyme (New England Biolabs) spezifischen Temperatur inkubiert und die DNA-Fragmente mittels der Agarose-Gelelektrophorese voneinander getrennt. Die Zusammensetzung der Ansätze ist nachfolgend in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Restriktionsansätze

	Analytischer Verdau (10 µl)	Präparativer Verdau (60 µl)
DNA	5 µl	50 µl
Enzym A	0,5 µl	2 µl
Enzym B	0,5 µl	2 µl
10 x Puffer	1 µl	6 µl
ddH ₂ O	3 µl	-

2.3.6 Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Mit Hilfe von präparativen Agarosegelen wurden die zu reinigenden DNA-Fragmente voneinander getrennt und anschließend als Einzelbanden aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Reinigung der DNA-Fragmente aus dem Agaroseblock sowie der PCR-Produkte erfolgte mit dem Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit nach Anleitung des Herstellers, wobei die Elution der DNA mit ddH₂O erfolgte. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation der DNA-Fragmente wurden der Vektor und das Insert in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl, sodass 2 µl des 10 x Ligationspuffers und 2 µl der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) verwendet wurden. Als Religationskontrolle für den Vektor diente ein Ansatz, dem anstelle des Inserts ddH₂O hinzugegeben wurde. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert und am folgenden Tag in *E. coli* Top10 transformiert.

2.3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.8.1 Primer-Design

Die Sequenz der Oligonucleotid-Primer wurde mit Hilfe der Software Clone Manager Professional (Sci-Ed Software) und dem Online Tool „Oligonucleotide Properties Calculator“ (OligoCalc) abgeleitet (Kibbe, 2007). Die Primer wurden in lyophilisierter Form von kommerziellen Anbietern (Eurofins MWG Operon / IDT Integrated DNA Technologies) erworben und anschließend in ddH₂O gelöst (100 pmol/µl).

Tabelle 5: Verwendete Primer

Name	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
JR53	GCGCCCATGGCAGATAAACCGCAGACAAG	<i>pbpA1</i> in pAMD (fw), NcoI
JR54	GCGCGGATCCTTAACCTATCTGGAATTTTAACAGTGG	<i>pbpA1</i> in pAMD (rev), BamHI
JR161	GCGCCCATGGCTTTGACACATGAAATATCAGAGAATGAAAA ACC	<i>lmo1549</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR162	GCGCGTCGACTTAAAAGTAACCTTTTTCTTTCAAACCTAATAT	<i>lmo1549</i> in pIMK3 (rev),

	AC	Sal
JR169	GCGCCCATGGATTCAAAAGATCAAACAATGTTTTACAACCTC	<i>reoM</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR170	GCGCGTCGACTCATTTCTCACCAATTCGTTATTTTTCAG	<i>reoM</i> in pIMK3 (rev), Sal
JR197	GCGCGGATCCCAATTATTTTGAATGGTGCGGTGTC	<i>reoY</i> upstream (fw), BamHI
JR198	TCCTTATTCGTCGACCATCTTTCCTCAGTCCCTTCCTG	<i>reoY</i> upstream (rev), Sall
JR199	GGAAAGATGGTCGACGAATAAGGAATAAATCCTAGTTAGTA GGG	<i>reoY</i> downstream (fw), Sall
JR200	CGCGCGAATTCCCAAGACTCAACCTCTTTCACCTC	<i>reoY</i> downstream (rev), EcoRI
JR201	GCGCGGATCCCGTCTCTGCTATTCTGTTTTTAACAAC	<i>Imo1549</i> upstream (fw), BamHI
JR202	CTGGATTTAGTCGACCAACATAAGAACAGCTCCTATTTTCATC	<i>Imo1549</i> upstream (rev), Sall
JR203	CTTATGTTGGTCGACTAAATCCAGAATACTGTTACAAAATA TC	<i>Imo1549</i> downstream (fw), Sall
JR204	CGCGCGAATTCTGAAGGTACACATATCATTACGCG	<i>Imo1549</i> downstream (rev), EcoRI
JR264	GCGCAGATCTGGCAAATACAGCATTGAACTATGTG	<i>reoM</i> upstream (fw), BglII
JR265	GCGCGGATCCAATCGAAGCACCTCATTCTTC	<i>reoM</i> upstream (rev), BamHI
JR266	GCGCGGATCCATGAGAATAATGGGTTTAGATGTCGGC	<i>reoM</i> downstream (fw), BamHI
JR267	GCGCGTCGACGCTAGGAATGTAGCAAGGATTTCTTC	<i>reoM</i> downstream (rev), Sall
SHW41	CGGGATCCTGGCTGCGATTGAACTAGGAAG	<i>mreB</i> upstream (fw), BamHI
SHW42	ATATGTCGACCATCTGTATTCTCTTTTCCTTCG	<i>mreB</i> upstream (rev), Sall
SHW43	ATATGTCGACTAAATGGACACACTCATTTATGTC	<i>mreB</i> downstream (fw), Sall
SHW44	GCATGCCATGGATAAACGCGGTTTGAGATAATC	<i>mreB</i> downstream (rev), NcoI
SHW815	GATCTATCGATGCATGCCATGGGCTAAATGACCAAGGAATT ACCG	<i>prpC</i> upstream (fw), NcoI
SHW816	CGCGTCGGGCGATATCGGATCCTTTCTTCCGCGTTTTGGTA ACG	<i>prpC</i> downstream (rev), BamHI
SHW817	CAATCATCATTTTAAAAGCACCTCACTATTTTTCAG	<i>prpC</i> upstream (rev)

SHW818	TGCTTTTAAAATGATGATTGGTAAGCGATTAAGC	<i>prpC</i> downstream (fw)
SHW819	GATCTATCGATGCATGCCATGGAGATAGAGGCAGAATAAGA CATC	<i>prkA</i> upstream (fw), NcoI
SHW820	CGCGTCGGGCGATATCGGATCCGGTATTTACAACCACTAC GTCG	<i>prkA</i> downstream (rev), BamHI
SHW821	CGTTCTTATTTTCATGAAGCATCCCTCCCTTTC	<i>prkA</i> upstream (rev)
SHW822	TGCTTCATGAAATAAGAACGGAGGAAATGTGCTG	<i>prkA</i> downstream (fw)
SHW830	GCGCGCTCTAGATGGACGATTTACGCAAAGAGCTCAG	<i>clpC</i> in B2H (fw), XbaI
SHW831	GCGCGCGGTACCTTAGCTTTTACTTTTTTAGAGGTTGTTTTTC	<i>clpC</i> in B2H (rev), KpnI
SHW832	GCGCGCTCTAGAAATTC AACAGTAATTGAACAAACTAGC	<i>clpP</i> in B2H (fw), XbaI
SHW833	GCGCGCGGTACCCCTTTTAAGCCAGATTTATTAATGATAATA TC	<i>clpP</i> in B2H (rev), KpnI
LR13	GATCTATCGATGCATGCCATGGTATAAGACAATTTACCCG GCC	<i>sepF</i> upstream (fw), NcoI
LR14	CGCGTCGGGCGATATCGGATCCAAGAAATCCGTAAGTTGT GGCGTG	<i>sepF</i> downstream (rev), BamHI
LR15	CTTCATCAGTCGACCATTTGTTACACCTCCATATTATCGTC	<i>sepF</i> upstream (rev), Sall
LR16	AACAAATGGTCGACTGATGAAGTAGAGGTGTGAGCTAG	<i>sepF</i> downstream (fw), Sall
LR17	CTAGACAGATCTATCGATGCATGCCATGGGAATAATGCTTG GTTCTTTTGC	<i>zapA</i> upstream (fw), NcoI
LR18	CCTCGCGTCGGGCGATATCGGATCCGATACCGCTAATCTTC GTAAAATC	<i>zapA</i> downstream (rev), BamHI
LR19	CATTTAGTCGACCATTTGCCACGTAAATTCCTCCTC	<i>zapA</i> upstream (rev), Sall
LR20	GTGGCAAATGGTCGACTAAATGATTTTAAATGCGATTATTTT AATTTTAC	<i>zapA</i> downstream (fw), Sall
SW51	ATACAGATGCCACAATTTTTTCTCAATAAACG	Versetzung Startcodon in pSW16 (fw)
SW52	TTGTGGCATCTGTATTCTCCTTTTCCTTCG	Versetzung Startcodon in pSW16 (rev)
SW53	GAAGGAGAGTGAAACCCATGGTTGGATTTGGTAATAAAGAT ATTGG	<i>mreB</i> in pIMK3 (fw), NcoI
SW54	GCATAATGGGATCGTCGACTTAGTTCAATTTTTTACGTTTAT ACATATCC	<i>mreB</i> in pIMK3 (rev), Sall
SW77	GTAAAACATTGcTTGATCTTTTGAATCCATGGGTTTCAC	T7A in <i>reoM</i> (rev)
SW78	GATCAA _g CAATGTTTTACAACCTCGGCGATGATTC	T7A in <i>reoM</i> (fw)
SW79	GTAAAACATGTCTTGATCTTTTGAATCCATGGGTTTCAC	T7D in <i>reoM</i> (rev)

SW80	GATCAAGACATGTTTTACAACCTTCGGCGATGATTC	T7D in <i>reoM</i> (fw)
SW110	GCGCGCGGATCCATGCATGCAGAATTTAGAACAGATAG	<i>prpC</i> in pIMK3 (fw), BamHI
SW111	GCGCGCGTCGACTCATGAAGCATCCCTCCCTTTC	<i>prpC</i> in pIMK3 (rev), Sall
SW112	GCGCGCGGATCCATGATGATTGGTAAGCGATTAAGCG	<i>prkA</i> in pIMK3 (fw), BamHI
SW113	GCGCGCGTCGACTTAATTTGGATAAGGGACTGTACCTTC	<i>prkA</i> in pIMK3 (rev), Sall
SW136	CTAAACGAGCTATCATACTTCTAGCATCCTTGTGAC	R66A in <i>reoM</i> (rev)
SW137	GTATGATAGCTCGTTTGAACGAGATGAAATTATCGAG	R66A in <i>reoM</i> (fw)
SW138	AATTTTCATCTGCTTCTAAACGACGTATCATACTTCTAGC	R70A in <i>reoM</i> (rev)
SW139	GTTTAGAAGCAGATGAAATTATCGAGGAAGTGTCAAAG	R70A in <i>reoM</i> (fw)
SW144	CCTTGTGAGCAGGAATATAAGCAGGATCGCCTG	R57A in <i>reoM</i> (rev)
SW145	TATATTCCTGCTCACAAGGATGCTAGAAGTATGATAC	R57A in <i>reoM</i> (fw)
SW146	GTATCATACTTGCAGCATCCTTGTGACGAGGAATATAAG	R62A in <i>reoM</i> (rev)
SW147	GGATGCTGCAAGTATGATACGTCGTTTGAACGAG	R62A in <i>reoM</i> (fw)

2.3.8.2 Standard-Protokoll der Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden DNA-Abschnitte für präparative (Amplifizierung der Inserts) oder analytische (Kolonie-PCR, Bestätigung von Deletionen/Insertionen) Zwecke amplifiziert. Je nach Verwendungszweck des PCR-Ansatzes wurden Gesamtvolumina zwischen 25-200 µl gewählt. Des Weiteren wurden die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit je nach Primer-Paar und der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst. Für präparative Anwendungen der DNA-Amplifizierung wurde die Thermo Scientific® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) verwendet, wohingegen für analytische Zwecke die *Taq*-DNA Polymerase (New England Biolabs) eingesetzt wurde. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie das Standard-PCR-Protokoll sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 6: PCR-Reaktionsansätze

Bestandteil	25 µl Ansatz (Phusion-Polymerase)	25 µl Ansatz (<i>Taq</i> -Polymerase)
Template-DNA	0,125 µl	5 µl
Puffer	5 µl	2,5 µl
40 mM dNTP's	0,25 µl	0,25 µl
Primer fw/rev (100 pmol/µl)	0,125 µl / 0,125 µl	0,2 µl / 0,2 µl
Polymerase	0,125 µl	0,25 µl
ddH ₂ O	19,25 µl	16,6 µl

Tabelle 7: Standard-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 s	} 30 Zyklen
Annealing	48-60°C	30 s	
Elongation	72°C	30s/kb	
Nachsynthese	72°C	10 min	
Pause	16°C	∞	

2.3.8.3 Site-directed mutagenesis

Die „site-directed mutagenesis“ nach Liu und Naismith (2008) wurde genutzt, um einzelne Nukleotide zu substituieren oder Deletionen/Insertionen in bereits bestehende Plasmide einzufügen (Liu und Naismith, 2008). Die verwendeten Primer besitzen einen komplementären Sequenzbereich von mindestens neun Nukleotiden am 5'-Ende und tragen beide die einzubringende Mutation. Mit Hilfe der eingesetzten Primer wurde das gesamte Template-Plasmid unter Verwendung des Standard-PCR-Protokolls amplifiziert, wobei die Elongationszeit auf 1 min/kb erhöht wurde. Der PCR-Ansatz wurde anschließend mit DpnI (New England Biolabs) für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert, um die parentale Plasmid-DNA abzubauen. Für die Transformation in *E. coli* TOP10 wurden 5 µl des Ansatzes verwendet.

2.3.8.4 Restriktionsfreie Klonierung

Die SOE-PCR wurde genutzt, um DNA-Fragmente in einen Vektor ohne die Verwendung von Restriktionsendonukleasen einzubringen. Dabei wurde das Insert als Mega-Primer genutzt und

die Sequenzbereiche am 5´ und 3´-Ende des Inserts so gewählt, dass diese 22 Basenpaare mit der Sequenz am Insertionsort des Vektors überlappen. Mit Hilfe des in Tabelle 8 beschriebenen PCR-Programms wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Der Ansatz wurde anschließend mit DpnI behandelt und 5 µl für die Transformation in *E. coli* TOP10 verwendet. Um die Effizienz der Methode zu erhöhen, wurde der linearisierte Vektor und der Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs) verwendet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und PCR-Programms für die SOE-PCR

Bestandteil	30 µl Ansatz	Schritt	Temperatur	Zeit
Phusion® PCR Master Mix	15 µl	Initiale Denaturierung	95°C	15:00 min
Insert	5 µl	Denaturierung	95°C	30 s
Vektor	10 µl	Annealing	45°C	30 s
ddH ₂ O	5 µl	Elongation	72°C	15:30 min
		Finale Elongation	72°C	15:00 min

2.3.8.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Zur Herstellung des Reaktionsansatzes (Tabelle 9) wurde der ABI BigDye Terminator 3.1 Premix (Thermo Scientific) verwendet. Das Auslesen der Sequenzierungsreaktion (Tabelle 10) erfolgte im Sequenzierlabor des RKI (MF2). Zur Auswertung der Sequenzierungsdaten wurde das Programm Clone Manager Professional 9 (Sci-Ed-Software) genutzt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Sequenzierungs-PCR

Bestandteil	Volumen
Template DNA	x µl (150-300 ng Plasmid-DNA, 1-30 ng für PCR-Produkte)
ABI-Puffer (5 x)	2 µl
BigDye 3.1	0,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 10: PCR-Programm der Sequenzierungsreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	96°C	1:30 min	
Denaturierung	96°C	10 s	} 25 Zyklen
Annealing	52°C	5 s	
Elongation	60°C	4 min	
Pause	4°C	∞	

2.3.9 Genomsequenzierung

Für die Genomsequenzierung wurde chromosomale DNA der einzelnen *L. monocytogenes*-Stämme hergestellt. Die Herstellung der DNA-Library sowie die Sequenzierung (Illumina MiSeq, Paired End Modus) wurde von der Sequenzierungseinheit des RKI in Berlin durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden anschließend mit dem Referenzgenom des *L. monocytogenes*-Stammes EGD-e (NC_003210.1) mit Hilfe der Geneious Software verglichen und auf einzelne Unterschiede in der Nukleotidsequenz (single nucleotide polymorphisms, SNPs) untersucht.

2.3.10 DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone

2.3.10.1 Transformation von *E. coli* (Mandel *et al.*, 1970; Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Transformation von *E. coli* wurden chemisch-kompetente Zellen hergestellt. Dazu wurden 25 ml LB-Medium 1:100 mit einer *E. coli*-Übernachtskultur beimpft und ca. 2 h bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert. Durch eine 5-minütige Zentrifugation (Biofuge 28 RS, Heraeus Sepatech) bei 4.581 x g und 4°C wurde die Zellsuspension pelletiert und das erhaltene Zellpellet in eiskaltem 0,1 M CaCl₂ (in Reinstwasser, Roth) aufgenommen. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis gehalten und die Zellen anschließend erneut für 5 min bei 4.581 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 750 µl 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Die zu transformierende DNA (1 µl Plasmid-DNA, 20 µl Ligationsansatz) wurde vorsichtig mit 100 µl der kompetenten Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 1 min bei 42°C im Wasserbad erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 3 min. Zur Regeneration der Zellen wurden diese vorsichtig mit 900 µl sterilem LB-Medium gemischt und unter Schütteln für 1 h bei 37°C inkubiert. Bei der Transformation von Plasmiden wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert, wohingegen bei der Transformation der Ligationsansätze der gesamte Transformationsansatz pelletiert und der

Überstand dekantiert wurde. Die Zellen wurden im Rückfluss resuspendiert und anschließend auf den selektiven Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.3.10.2 Transformation von *L. monocytogenes* (Monk *et al.*, 2008)

Zur Transformation von *L. monocytogenes* wurden elektrokompente Zellen hergestellt. Dazu wurde eine Übernachtskultur 1:100 in 50 ml BHI verdünnt und die Kultur ca. 3 h bei 250 rpm und 37°C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,2 erreicht wurde. Nach der Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 10 µg/ml), wurde die Kultur für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4.581 x g und 4°C geerntet und das erhaltene Zellpellet anschließend in 10 ml kaltem Sucrose-Glycerol-Waschpuffer (SGWB) resuspendiert. Daraufhin wurde der Waschschrift aus Zentrifugation und Resuspension zwei weitere Male wiederholt, wobei das Pellet in 10 bzw. 5 ml SGWB aufgenommen wurde. Nachdem das Zellpellet in 5 ml SGWB resuspendiert wurde, wurden 5 µl 10 mg/ml Lysozym hinzugefügt und die Zellsuspension 20 min bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut bei 4.581 x g für 5 min zentrifugiert und anschließend in 2,5 ml SGWB aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 350 µl SGWB resuspendiert und als 75 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 75 µl der elektrokompenten Zellen mit 30 µl der gefällten Plasmid-DNA gemischt und anschließend in eine Elektroporationsküvette (VWR, 2 mm) transferiert. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des Gene Pulser Xcell™ Elektroporators (Bio Rad) bei den Einstellungen 25 µF, 200 Ω und 2400V (PreSet-Protokoll für *Agrobacterium tumefaciens*). Zur Regeneration der Zellen wurde 1 ml BHI-Medium zu dem Transformationsansatz hinzugegeben und die Zellen darauf 1,5 h bei 37°C (pIMK-Derivate) bzw. 30°C (pMAD-Derivate) inkubiert. Die Transformationsansätze wurden anschließend pelletiert, im Rückfluss resuspendiert und auf Selektionsagar ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C (pIMK3-Derivate) bzw. zwei Tage bei 30°C (pMAD-Derivate).

SGWB-Puffer (sterilfiltriert):	Glycerin	10%
	Sucrose	500 mM
	100 mM NaOH	pH7,0 einstellen

2.3.10.3 Deletion von *L. monocytogenes*-Genen

Die von Arnaud *et al.* 2004 beschriebene Methode zur Erzeugung von „clean deletion mutants“ wurde genutzt, um in *L. monocytogenes* Deletionsmutanten herzustellen. Dabei wurden die Bereiche, die sich *upstream* und *downstream* des betreffenden Gens befinden, inklusive dessen Start- und Stoppcodon, mittels PCR amplifiziert, anschließend über eine SOE-PCR miteinander fusioniert und das Fusionsprodukt in den pMAD-Vektor eingebracht. Das pMAD-Derivat wurde mittels Elektroporation in den jeweiligen *L. monocytogenes*-Stamm transformiert und zur Selektion auf Agarplatten mit Erythromycin und X-Gal zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zwei blaue Kolonien wurden anschließend zum Erzwingen der chromosomalen Integration des Plasmids auf dem gleichen Selektivmedium vereinzelt. Dabei erfolgte die Inkubation zwei Tage bei 42°C (bzw. 37°C). Anschließend wurde mit ca. 5-8 erhaltenen Einzelkolonien eine 3 ml BHI-Kultur beimpft. Diese wurde 2 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert und dann weitere 4 h bei 42°C (bzw. 37°C). Durch die Temperaturerhöhung wurde der Plasmidverlust forciert, da der pMAD-Vektor einen Hitze-sensitiven *origin of replication* besitzt. Nach der insgesamt 6-stündigen Inkubation wurden 100 µl der Kultur bis 10⁻⁵ verdünnt und dreimal jeweils 100 µl der letzten drei Verdünnungsstufen auf BHI-Agarplatten mit X-Gal ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die weißen Klone parallel auf BHI/X-Gal- und BHI/X-Gal/Erythromycin-haltigen Agarplatten vereinzelt, um auf die Klone zu selektieren, bei denen durch den Plasmid-Verlust entweder die Wildtypsituation wiederhergestellt wurde oder durch ein weiteres *double cross-over* sowohl das pMAD-Plasmid als auch das zu deletierende Gen verloren gegangen sind. Mittels PCR wurden die weißen, Erythromycin-sensitiven Klone auf die Deletion und den Verlust des Deletionsplasmids getestet und somit die gewünschten Deletionsmutanten isoliert.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Um Proteine rekombinant in *E. coli* zu exprimieren wurde 1 l LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer *E. coli*-Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert und anschließend die Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert, welche über Nacht bei 18°C und 180 rpm erfolgte. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 11.325 x g und 4°C (Beckman Avanti™ J-25) geerntet und einmal mit 20 ml ZAP-Puffer gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 12 ml ZAP-Puffer resuspendiert und mit dem Serin-Protease Inhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) versetzt (Endkonzentration: 1mM).

Zum Zellaufschluss wurden die Zellen zunächst für 3 x 30 s mit dem Sonifier Ultraschall behandelt (Power Output ~40%) und anschließend mit dem EmulsiFlex C3-Homogenisator (Avestin Europe GmbH) aufgeschlossen. Um das Zelllysate von den Zelltrümmern zu trennen wurde der Ansatz zunächst bei 4.581 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen transferiert und eine Ultrazentrifugation (L-60 Ultracentrifuge, Beckmann) für 30 min bei 56.459 x g durchgeführt.

Zur Reinigung von Strep-Tag®-Fusionsproteinen aus dem Zelllysate wurde das Strep-Tactin® Superflow System (IBA GmbH) verwendet. Dazu wurden 1-2 ml Strep-Tactin® Suspension auf eine Chromatographie-Säule (BioRad Laboratories GmbH) gegeben und mit 2 ml Waschpuffer (Puffer W) äquilibriert. Anschließend wurde das Zelllysate auf die Säule gegeben, wobei Strep-Tag®-Fusionsproteine an der Säulenmatrix gebunden wurden. Durch 5 Waschschrte mit jeweils 1 ml Puffer W wurden unspezifisch gebundene Bestandteile des Zellextrakts von der Säulenmatrix entfernt. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch die Zugabe von 6 x 500 µl Puffer E auf die Säulenmatrix, wobei die gebundenen Strep-Tag®-Fusionsproteine durch die höhere Bindungsaffinität des im Puffer E enthaltenen Desthiobiotins (IBA GmbH) von der Säulenmatrix verdrängt wurden. Zur Regeneration des Säulenmaterials wurde dieses dreimal mit 5 ml Puffer R gewaschen. Eine Probe des Durchflusses sowie die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und anschließend bei -20°C gelagert.

ZAP-Puffer:	Tris-HCl pH7,5	50 mM
	NaCl	200 mM
Puffer W:	Tris-HCl, pH8,0	100 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
Puffer E:	Desthiobiotin	2,5 mM
	Puffer W	ad. 10 ml
Puffer R:	2(4-Hydroxyphenylazo)Benzoessäure (HABA)	1 mM
	Puffer W	ad. 1l

2.4.2 Isolation zellulärer Proteine von *L. monocytogenes* und *B. subtilis*

Für die Isolierung von zellulären Proteinen wurde eine 25 ml BHI-Kultur der *L. monocytogenes*-Stämme bzw. eine 50 ml LB-Kultur der *B. subtilis*-Stämme bis zu einer OD₆₀₀ von ~1,0 kultiviert und die Zellen durch Zentrifugation bei 4.581 x g und 4°C für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde mit ZAP-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml ZAP-Puffer mit 1 mM PMSF (Stammlösung 100 mM in EtOH) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung (Power output ~40%) für 10 min bei *L. monocytogenes* und 5 min bei *B. subtilis*. Die Zelltrümmer wurden durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 16.100 x g abgetrennt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Proteinextrakt erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Lagerung bei -20°C aufbewahrt.

2.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Als Bradford-Reagenz wurde die Roti[®]-Nanoquant Lösung (5 x Konzentrat, Roth), welche 1:5 in ddH₂O verdünnt wurde, verwendet. 1-5 µl der Proteinlösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei λ=595 nm gemessen, wobei das Bradford-Reagenz mit 1-5 µl ZAP-Puffer als Leerwert verwendet wurde. Die Proteinkonzentration wurde über nachfolgend beschriebene Formel berechnet, welche aus einer Kalibriergerade mit BSA ermittelt wurde.

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{A_{595}}{(0,0536 * x \mu\text{l})}$$

2.4.4 Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit einer Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell-Kammer (BioRad Laboratories GmbH) durchgeführt. Die SDS-Polyacrylamidgele zur Separierung der Proteinproben wurden nach Laemmli (1970) hergestellt (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung des Trenn- und des Sammelgels sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 zusammengefasst.

Die Proben wurden vor der Auftragung 1:4 mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Als Größenstandard wurde der PageRuler[™] Prestained Protein Marker (Thermo Scientific) verwendet. Die Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell-Kammer wurde mit 1 x SDS Laufpuffer befüllt und die SDS-Gelelektrophorese für 90 min bei 150 V durchgeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel (2 Gele)	10%	12,5 %	15%
30% Acrylamid/Bisacrylamid	3,3 ml	4,2 ml	5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
ddH ₂ O	4 ml	3,1 ml	2,3 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel (2 Gele)	4%
30% Acrylamid/Bisacrylamid	530 µl
0,5 M Tris-HCl, pH6,8	1 ml
ddH ₂ O	2,4 ml
10% SDS	40 µl
10% APS	50 µl
TEMED	4 µl

4 x SDS-Probenpuffer:	Tris-HCl pH6,8	200 mM
	Glycerin	40%
	SDS	8%
	β-Mercaptoethanol	4%
	Bromphenolblau	0,1%
1 x SDS-Laufpuffer	10 x Rotiphorese® SDS-PAGE (Roth)	100 ml
	ddH ₂ O	ad. 1 l

2.4.5 Kolloidale Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Coomassie-Färbelösung verwendet. Die Polyacrylamidgele wurden über Nacht in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und am folgenden Tag durch das Ersetzen der Färbelösung durch Wasser entfärbt.

Coomassie-Färbelösung:	5 x Roti®-Blue (Roth)	20 ml
	Methanol	20 ml
	ddH ₂ O	60 ml

2.4.6 Western Blot

Für den Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Immobilon®-P^{SQ} Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Merck Millipore GmbH) wurde eine Semi-Dry-Blot Apparatur (VWR) verwendet. Drei Lagen Whatman Papier (Whatman™ Grade GB003; GE Healthcare) wurden in Western Blot-Transferpuffer äquilibriert und auf die Unterseite der Gelapparatur gelegt. Darauf folgte die Membran, welche zunächst in Methanol aktiviert und darauf noch einmal mit Transferpuffer gewaschen wurde. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert und anschließend luftblasenfrei auf die Membran gelegt. Zum Schluss wurden drei weitere Lagen Whatman-Papier auf die Membran gelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 60 min bei 100 mA pro Gel.

10 x Western Blot-Transferpuffer:	Tris	30,3 g
	Glycin	144 g
	ddH ₂ O	ad. 1 l
1 x Western Blot-Transferpuffer:	10 x Western Blot-Transferpuffer	100 ml
	Methanol	100 ml
	ddH ₂ O	ad. 1 l

2.4.7 Nachweis von Proteinen durch Immundetektion

Nach dem Western Blot wurde die PVDF-Membran mindestens 1-2 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C mit Blockierungslösung inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers, welcher spezifisch an eine bestimmte Zielstruktur (Protein, Strep-Tag) bindet. Je nach Antikörper wurden unterschiedliche Konzentrationen (Tabelle 13) eingesetzt und die Membran 3-4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1 x TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären, Horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelten Antikörper, welcher 1:10.000 in Blockierungslösung verdünnt wurde, erfolgte für mindestens 1 h bei RT. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit 1 x TBST gewaschen und darauf in eine Schale mit dem ECL-Substrat (Enhanced Chemiluminescence Substrate, Thermo Scientific) gegeben. Zur

Detektion wurde die Membran in eine Folie gelegt und die Proteinbanden mit Hilfe des Chemilumineszenz-Imagers (Fusion FX Spectra, Vilber Lourmat) und Belichtungszeiten von 1-10 min sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mit der Evolution Capt Edge Software und zur Quantifizierung der Signalintensitäten wurde die ImageJ Software genutzt.

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Antikörper-Typ	Antigen	Verdünnung	Hersteller
<u>Primärer Antikörper</u>				
Anti-ClpC	Kaninchen-IgG	ClpC (<i>B. subtilis</i>)	1:10000	Gerth <i>et al.</i> , 2004
Anti-DivIVA	Kaninchen-IgG	DivIVA (<i>B. subtilis</i>)	1:5000	Marston <i>et al.</i> , 1998
Anti-MurAA	Kaninchen-IgG	MurAA (<i>B. subtilis</i>)	1:5000	Kock <i>et al.</i> , 2004
Anti-GlmS	Kaninchen-IgG	GlmS (<i>B. subtilis</i>)	1:5000	Gerth <i>et al.</i> , 2008
Anti-IlvB	Kaninchen-IgG	IlvB (<i>B. subtilis</i>)	1:5000	Gerth <i>et al.</i> , 2008
Anti-MreB	Kaninchen-IgG	MreB (<i>B. subtilis</i>)	1:5000	Jones <i>et al.</i> , 2001
<u>Sekundärer Antikörper</u>				
Anti-Kaninchen IgG	Ziege-IgG	Kaninchen-IgG	1:10000	Sigma

10 x TBS (pH8,0):	Tris/HCl	12,114 g
	NaCl	80 g
	ddH ₂ O	ad. 1 l
1 x TBST:	Tween 20	0,1%
	1 x TBS	ad. 1 l
Blockierungslösung:	Magermilchpulver	2,5%
	Tween 20	0,1%
	1 x TBS	ad. 1 l

2.5 “Bacterial Adenylate Cyclase-based Two-Hybrid“ (BACTH)-System

Das BACTH-System wurde verwendet, um *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei wurden die zu testenden Proteine als Fusionsproteine mit zwei verschiedenen Fragmenten (T18 und T25) der katalytischen Domäne der *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase in einem *E. coli cya* Stamm (BTH101) exprimiert. Bei einer Interaktion der zu untersuchenden Proteine können auch die Fragmente der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase einen funktionellen Komplex bilden, sodass der *E. coli cya* Stamm wieder cAMP bilden kann. Durch

die Synthese des cAMP wird die Transkription des *lacZ*-Gens aktiviert, welches für eine β -Galactosidase codiert. Diese ist wiederum in der Lage das im Selektivmedium enthaltene X-Gal zu einem blauen Farbstoff zu hydrolysieren, sodass bei einer Interaktion der Proteine eine Blaufärbung der Kolonien entsteht (Karimova *et al.*, 1998; Ladant und Ullmann, 1999). Als Kontrolle wurden die Leervektoren pUT18 und pKT25 verwendet. Die T18- und T25-Plasmide wurden in chemisch kompetente BTH101-Zellen (Kapitel 2.3.10.1) co-transformiert. Dazu wurde die DNA-Konzentration nach der Isolation der Plasmide auf 80 ng/ μ l mit ddH₂O eingestellt und anschließend jeweils 1 μ l der T18-Plasmide mit 1 μ l der T25-Plasmide in einer 96-well-Platte gemischt. Zu den Plasmiden wurden 10 μ l der kompetenten BTH101-Zellen gegeben und die Transformation wie in Kapitel 2.3.10.1 beschrieben durchgeführt, wobei der Hitzeschock für 45 s erfolgte. Zur Regeneration der Zellen wurden 90 μ l LB-Medium hinzugefügt und der Transformationsansatz 2 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 6 μ l der Ansätze auf selektive Agarplatten getropft und die Platten zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Selektive Agarplatten:	LB-Agar versetzt mit:	
	IPTG	0,1 mM
	X-Gal	50 μ g/ml
	Kanamycin	25 μ g/ml
	Ampicillin	100 μ g/ml

2.6 Phänotypische Charakterisierung

2.6.1 Wachstumskurven

Die Wachstumskurven wurden entweder manuell durch stündliche Probennahme und Bestimmung der optischen Dichte bei $\lambda = 600$ nm oder mit Hilfe des Multiskan Sky Microplate Spectrophotometers (Thermo Fisher) erstellt. Für die manuelle Bestimmung des Wachstumsverhaltens wurde eine 20 ml-Hauptkultur aus einer Übernachtskultur auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt und anschließend bei 37°C oder 42°C inkubiert, wobei die optische Dichte stündlich gemessen wurde. Die Erstellung von Wachstumskurven mittels des Microplate Readers erfolgte, indem zunächst eine 3 ml-Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt wurde. Von diesen 3 ml wurden 200 μ l für das Beimpfen einer 96-well-Platte verwendet, wobei für jeden Stamm innerhalb einer Platte ein technisches Triplikat angefertigt wurde. Die Platte wurde anschließend in einer Kinetikschleife unter Schütteln bei 37°C bzw. 42°C inkubiert und die optische Dichte (OD₆₀₀) in den einzelnen Wells in Abständen von 5 min gemessen.

2.6.2 Agardiffusionstest und MHK-Bestimmung

Zur Charakterisierung der verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämme bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber unterschiedlichen antibakteriellen Substanzen wurden die Stämme aus einer Übernachtskultur mit einem sterilen Tupfer gleichmäßig auf einer BHI-Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurden Whatman Filter Disks (Durchmesser 6 mm, GE Healthcare) mit 10 µl der zu testenden Substanz (PC190723 [1 mg/ml], Ceftriaxon [10 mg/ml]) benetzt und vorsichtig mit einer Pinzette auf die beimpfte Agarplatte gelegt. Nach einer Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurde der Durchmesser des entstandenen Hemmhofs mit einem Lineal ausgemessen. Die Antibiotikaresistenztestung erfolgte in technischen und biologischen Replikaten. Darüber hinaus wurden Ceftriaxon-Teststreifen (0,016-256 µg/ml, bestbion dx) zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) verwendet.

2.6.3 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Zur Mikroskopie der verschiedenen Bakterienstämme wurden diese bis zur exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} \sim 0,3-0,5$) bei 37°C (bzw. 30°C bei Stämmen mit Expression von Fluoreszenzproteinen) angezogen. Die Objektträger wurden mit 1% Agarose (in H₂O) beschichtet und 0,5 µl der Bakterienkultur auf die Agaroseschicht aufgetragen. Nach dem Trocknen der Probe wurde diese mit einem Deckglas abgedeckt und im Phasenkontrast des Nikon Eclipse Ti Mikroskops untersucht und die Bilder über die gekoppelte Nikon DS-MBWc CCD Kamera aufgenommen. Zur Bestimmung der Zelllängen wurden 100 µl einer Bakteriensuspension mit 1 µl einer Nilrot-Lösung (100 mg/ml in DMSO) für 5 min bei 37°C zur Färbung der Zellmembran inkubiert und anschließend 0,5 µl auf den Objektträger aufgetragen und im TRITC-Kanal mikroskopiert. Mit den Messfunktionen der Nikon NIS-Elements AR Software wurden 300 Zellen pro Stamm auf den aufgenommenen Bildern vermessen.

2.6.4 Probenvorbereitung zur Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie

Die Transmissions- (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde in Kooperation mit Lars Möller und Gudrun Holland aus der Abteilung für Spezielle Licht- und Elektronenmikroskopie des RKI in Berlin durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die Bakterienkulturen bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,6 (mittlere logarithmische Wachstumsphase) bei 37°C in BHI-Medium kultiviert und die Zellen anschließend durch eine 2-minütige Zentrifugation bei 4.581 x g geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Fixativ resuspendiert und für 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Fixativ:	HEPES, pH7,4	0,05 M
	Paraformaldehyd	1%
	Glutaraldehyd	2,5%

3. Ergebnisse

3.1 Identifikation und Charakterisierung von *gpsB*-Suppressormutationen

3.1.1 Wachstumsverhalten der *gpsB*-Suppressorstämme

Im Rahmen eines vorangegangenen Promotionsprojekts wurden *gpsB*-Suppressorstämme charakterisiert, welche den Hitze-sensitiven Phänotyp der Δ *gpsB*-Mutante supprimieren (Rismondo *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Neben den bereits beschriebenen Suppressormutationen (Rismondo *et al.*, 2017) wurden zudem durch die Genomsequenzierung Mutationen in den Genen *lmo1503*, *lmo1549* und *lmo1921* gefunden, für welche zum Zeitpunkt der Identifizierung noch keine Funktion bekannt war (Rismondo *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). *Lmo1503* ist ein 10,5 kDa großes Protein, welches eine DUF965-Domäne besitzt, und ist in den *Firmicutes* konserviert. *Lmo1921* besitzt eine Größe von 21 kDa und kommt ausschließlich in den *Bacilli* vor. *Lmo1921* hat eine UPF0302-Domäne mit einem IDEAL-Motiv, welches sich in der Regel am C-Terminus von Proteinen der UPF0302-Familie befindet. Beide Domänen sind jedoch uncharakterisiert und haben keine bekannte Funktion. Das 25 kDa große *Lmo1549*-Protein gehört zur RadC-Proteinfamilie und besitzt eine MPN_DUF2466-Domäne, welche ein JAB1/MPN/Mov34-Metalloenzym-Motiv (JAMM-Motiv) enthält. Dieses Motiv ist im Zusammenhang mit der Koordination von Zink-Ionen und dem aktiven Zentrum von Isopeptidasen beschrieben (Rawlings und Barrett, 1995; Cope *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2002). *Lmo1549* kommt neben den *Firmicutes* auch in Cyanobakterien, Proteobakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, und den Enterobakterien, wie *E. coli*, vor. Keine der untersuchten Proteinsequenzen besitzt bekannte Signalpeptide oder Transmembranregionen.

Zur Charakterisierung der Suppressorstämme wurden die Stämme *shg5* (Δ *gpsB clpC* R762S *lmo1549* L44S), *shg8* (Δ *gpsB lmo1921* H87Y), *shg10* (Δ *gpsB lmo1921* TAA74) und *shg12* (Δ *gpsB lmo1503* RBS-Mutation) (*shg* = *suppression of heat sensitive growth*) zunächst bezüglich ihres Wachstumsverhaltens bei 37°C und 42°C untersucht, um den supprimierenden Effekt der Punktmutationen zu bestätigen. Wie in Abbildung 5 (A, B) ersichtlich, zeigten alle *shg*-Suppressorstämme Wildtyp-ähnliches Wachstum sowohl bei 37°C als auch bei 42°C, sodass eine vollständige Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps vorlag. Zur weiteren Charakterisierung der Suppressorgene und des Mechanismus der Suppression wurden *lmo1503*-, *lmo1549*- und *lmo1921*-Einzelmutanten und Δ *gpsB*-Doppelmutanten erzeugt. Diese wurden ebenfalls auf ihr Wachstumsverhalten bei 37°C und 42°C getestet (Abbildung 5 C, D). Bei 37°C wurden keine Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen der Δ *lmo1503*-, Δ *lmo1549*- und Δ *lmo1921*-

Einzelmutante und den jeweiligen $\Delta gpsB$ -Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. Bei 42°C zeigten die $\Delta lmo1503$ -, $\Delta lmo1549$ - und $\Delta lmo1921$ -Einzelmutanten ebenfalls Wildtyp-ähnliches Wachstum. Die Deletionen von *lmo1503* und *lmo1921* im $\Delta gpsB$ -Hintergrund führten zu einer vollständigen Suppression des Hitze-sensitiven Phänotyps der $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42°C, wohingegen die Deletion von *lmo1549* nur zu einer partiellen Suppression beitrug.

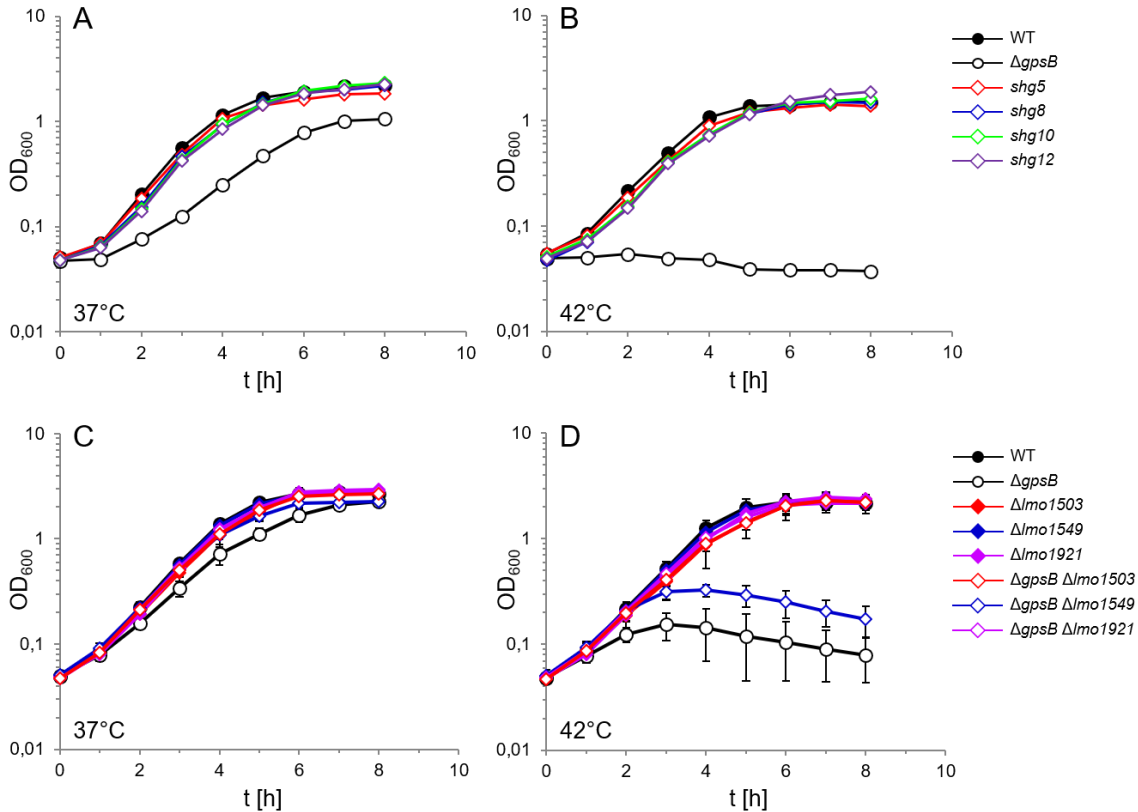


Abbildung 5: Suppression des Hitze-sensitiven $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Mutationen in *lmo1503*, *lmo1549* und *lmo1921*. (A, B) Effekt der Suppressormutationen auf das Wachstum der *L. monocytogenes* $\Delta gpsB$ -Mutante. Wachstumsverhalten der isolierten *shg*-Suppressorstämme *shg5* ($\Delta gpsB$ *clpC* R762S *lmo1549* L44S), *shg8* ($\Delta gpsB$ *lmo1921* H87Y), *shg10* ($\Delta gpsB$ *lmo1921* TAA74) und *shg12* ($\Delta gpsB$ *lmo1503* RBS-Mutation) sowie des Wildtyps (EGD-e) und der $\Delta gpsB$ -Mutante (LMJR19) bei 37°C (A) und 42°C (B) in BHI-Medium. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. (C, D) Auswirkung der Deletion von *lmo1503*, *lmo1549* und *lmo1921* auf das Wachstumsverhalten des Wildtyps und der $\Delta gpsB$ -Mutante von *L. monocytogenes*. Dargestellt ist das Wachstum der Einzelmutanten LMSW18 ($\Delta lmo1549$), LMSW30 ($\Delta lmo1503$), LMSW32 ($\Delta lmo1921$) und der $\Delta gpsB$ -Doppelmutanten LMJR119 ($\Delta gpsB$ $\Delta lmo1549$), LMJR120 ($\Delta gpsB$ $\Delta lmo1921$), LMJR137 ($\Delta gpsB$ $\Delta lmo1503$) sowie des Wildtyps (EGD-e) und der $\Delta gpsB$ -Mutante (LMJR19) bei 37°C (C) und 42°C (D) in BHI-Medium. Die in (C) und (D) gezeigten Daten sind Durchschnittswerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen.

3.1.2 Morphologie der *gpsB*-Suppressorstämme

Mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)- und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahmen wurden die $\Delta lmo1503$ -, $\Delta lmo1549$ - und $\Delta lmo1921$ -Einzelmutanten und $\Delta gpsB$ -Doppelmutanten auf morphologische Unterschiede bezüglich der äußeren Form und der Oberfläche der Zellen (REM) sowie der Bildung der Septen und der Dicke der Zellwand (TEM) untersucht. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen konnten keine Unterschiede bezüglich der Septenmorphologie zwischen den Mutanten und dem Wildtyp festgestellt werden (Abbildung A1, A). Anhand der TEM-Aufnahmen war ersichtlich, dass die $\Delta lmo1503$ - und die $\Delta lmo1921$ -Einzelmutanten im Vergleich zum Wildtyp leichte Aufwerfungen an der Außenseite der Zellwand besaßen und vereinzelt eine Verdickung der Zellwand an den Zellpolen beobachtet werden konnte, welche beim Wildtyp und auch den $\Delta lmo1549$ -Mutanten nicht auftrat (Abbildung A1, B). Die stärksten Unterschiede zeigten sich jedoch in der allgemeinen Zellmorphologie, da die $\Delta lmo1503$ - und die $\Delta lmo1921$ -Einzelmutanten im Vergleich zum Wildtyp (EGD-e) und der $\Delta lmo1549$ -Einzelmutante eine leichte Krümmung aufwiesen (Abbildung 6, A). Zudem konnte bei der $\Delta lmo1503$ -Mutante vereinzelt die Bildung von Zellaggregaten beobachtet werden. Darüber hinaus besaß die $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante eine deutlich größere Zelllänge. Um diesen Effekt zu quantifizieren, wurde die Zellmembran der jeweiligen Stämme mit Nilrot gefärbt und die Zelllängen bestimmt (Abbildung 6, B). Dadurch wurde ersichtlich, dass die durchschnittliche Zelllänge der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante bei etwa 1,7 μm lag, während die Zelllängen der anderen Einzel- und $\Delta gpsB$ -Doppelmutanten der Zelllänge des Wildtyps entsprachen (1,25 μm). Die erhöhte Zelllänge der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante lässt darauf schließen, dass die gemeinsame Deletion von *lmo1549* und *gpsB* zu einem Defekt in der Zellteilung führt und *lmo1549* somit eine Funktion in der Zellteilung besitzt. Die Deletionen von *lmo1503* und *lmo1921* in der $\Delta gpsB$ -Mutante zeigten keinen Einfluss auf die Zelllänge, welches auf eine Funktion außerhalb der Zellteilung hindeutet.

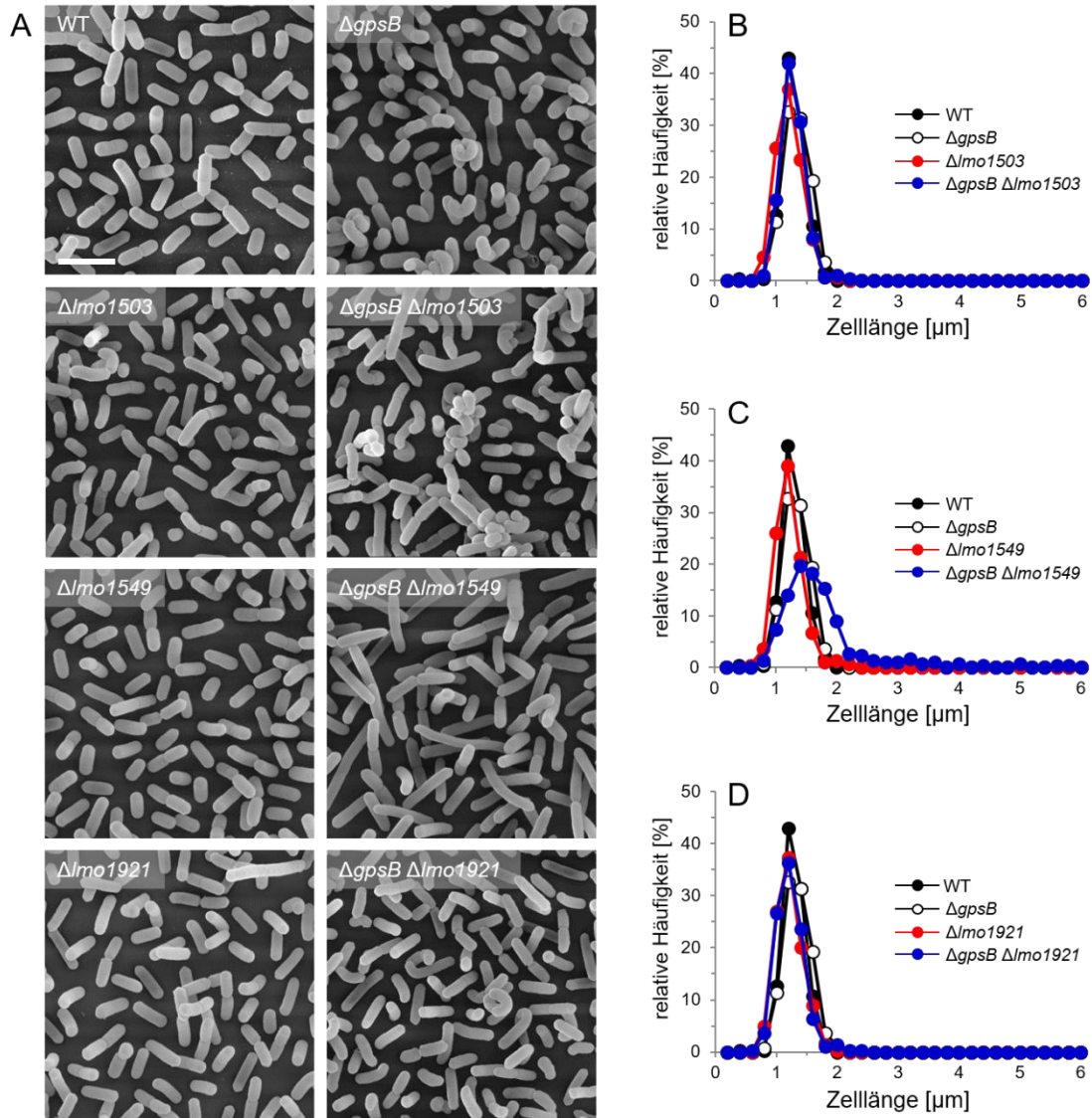


Abbildung 6: Einfluss der Deletionen von *Imo1503*, *Imo1549* und *Imo1921* auf die Zellmorphologie.

(A) Rasterelektronenmikroskopie (REM) der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMSW30 ($\Delta Imo1503$), LMJR137 ($\Delta gpsB \Delta Imo1503$), LMSW18 ($\Delta Imo1549$), LMJR119 ($\Delta gpsB \Delta Imo1549$), LMSW32 ($\Delta Imo1921$) und LMJR120 ($\Delta gpsB \Delta Imo1921$) zeigte Unterschiede in der allgemeinen Zellmorphologie. (B, C, D) Darstellung der Zelllängenverteilung der jeweiligen Einzel- und $\Delta gpsB$ -Doppelmutanten. Mit Hilfe einer Nilrot-Färbung der Zellmembran und anschließender Zelllängenmessung wurden für jeden Stamm Triplikate mit jeweils 300 Zellen vermessen, von denen eine repräsentative Messung dargestellt wurde.

3.1.3 MurA-Akkumulation in den *gpsB*-Suppressorstämmen

Wie von Rismondo *et al.*, 2017 beschrieben basiert einer der möglichen Mechanismen zur Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps auf der Stabilisierung der UDP-*N*-acetylglucosamin 1-carboxyvinyltransferase MurA, welche den ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese katalysiert. Dieser Effekt beruht auf der Annahme, dass es in der Abwesenheit von GpsB zu einer Fehlregulation von PBP A1 kommt, welches wiederum zu einem ineffizienten Einbau von Peptidoglykanvorstufenmolekülen in die wachsende Peptidoglykankette führt. Es wird angenommen, dass die Akkumulation von MurA eine Stimulation der Peptidoglykanbiosynthese bewirkt und somit den unkontrollierten Verbrauch von Lipid II-Molekülen durch PBP A1 kompensiert. Neben der Akkumulation von MurA war auch die artifizielle Überproduktion von MurA im Δ *gpsB*-Hintergrund ausreichend um den Hitze-sensitiven Phänotyp der Δ *gpsB*-Mutante bei 42°C zu supprimieren (Rismondo *et al.*, 2016; Rismondo *et al.*, 2017). Sowohl in *B. subtilis* als auch in *L. monocytogenes* konnte MurA als Substrat der ClpCP-Protease identifiziert werden (Kock *et al.*, 2004; Rismondo *et al.*, 2017). In *L. monocytogenes* führte die Deletion von *clpC*, welches für die ATPase-Untereinheit der ClpCP-Protease codiert, in der Einzel- und der Δ *gpsB*-Doppelmutante zur Akkumulation von MurA und konnte somit ebenfalls den Wachstumsdefekt der Δ *gpsB*-Mutante bei 42°C supprimieren (Rismondo *et al.*, 2017). Aufgrund dieser Beobachtungen wurden die Δ *lmo1503*-, Δ *lmo1549*- und Δ *lmo1921*-Mutanten mit Western Blots auf die Akkumulation von MurA getestet und die Intensität der MurA-Signale von drei Replikaten mittels der ImageJ Software quantifiziert (Abbildung 7). Für die Δ *lmo1503*- und Δ *lmo1921*-Einzel- sowie die jeweiligen Δ *gpsB*-Doppelmutanten konnte eine MurA-Akkumulation beobachtet werden, die vergleichbar mit der Erhöhung der MurA-Menge in der Δ *clpC*-Mutante war. Die Deletion von *lmo1549* hingegen führte weder in der Einzel- noch in der Δ *gpsB*-Doppelmutante zu einer Akkumulation von MurA und entsprach etwa der MurA-Menge, welche sich im Wildtyp nachweisen ließ. Demzufolge scheint die Suppression des Hitze-sensitiven Δ *gpsB*-Phänotyps in den Δ *gpsB* Δ *lmo1503*- und Δ *gpsB* Δ *lmo1921*-Doppelmutanten ebenfalls über die Akkumulation von MurA zu erfolgen, wohingegen die partielle Suppression durch die Deletion von *lmo1549* im Δ *gpsB*-Hintergrund MurA-unabhängig ist.

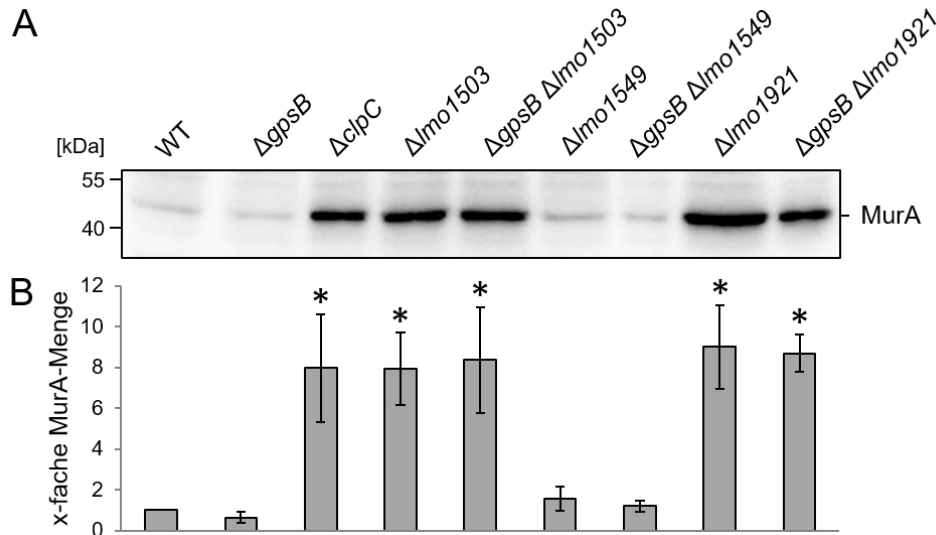


Abbildung 7: Effekt der Deletionen von *Imo1503*, *Imo1549* und *Imo1921* auf die MurA-Akkumulation. (A) MurA-Mengen in den $\Delta Imo1503$ -, $\Delta Imo1549$ - und $\Delta Imo1921$ -Einzel- und $\Delta gpsB$ -Doppelmutanten LMSW30 ($\Delta Imo1503$), LMJR137 ($\Delta gpsB \Delta Imo1503$), LMSW18 ($\Delta Imo1549$), LMJR119 ($\Delta gpsB \Delta Imo1549$), LMSW32 ($\Delta Imo1921$), LMJR120 ($\Delta gpsB \Delta Imo1921$), dem Wildtyp (EGD-e) und der $\Delta gpsB$ -Mutante (LMJR19). Als Kontrolle wurde der Stamm LMJR138 ($\Delta clpC$) mitgeführt. (B) Quantifizierung der MurA-Signalintensitäten im Western Blot der unter (A) getesteten Stämme. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Replikaten berechnet, wobei der Wert des Wildtyps auf 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtyp sind durch einen Stern gekennzeichnet ($P < 0,05$, t -Test).

Basierend auf diesen vorläufigen Ergebnissen bezüglich des Zellteilungsphänotyps der $\Delta gpsB \Delta Imo1549$ -Doppelmutante und der nicht vorliegenden MurA-Akkumulation in der $\Delta Imo1549$ -Mutante wurde gefolgert, dass sich der Mechanismus der partiellen Suppression des Hitze-sensitiven Phänotyps durch die Deletion von *Imo1549* von den Effekten der *Imo1503*- und der *Imo1921*-Deletion unterscheidet, sodass die Charakterisierung der Gene/Proteine im Folgenden unabhängig voneinander erfolgte.

Da die Deletion der Gene *Imo1503* und *Imo1921* zu einer Akkumulation von MurA führte, welche vergleichbar mit der MurA-Menge in den Zellextrakten der $\Delta clpC$ -Mutante war, wurde vermutet, dass diese Gene an der ClpCP-abhängigen Degradation von MurA beteiligt sein könnten. Aufgrund dieser Vermutung und den im Folgenden beschriebenen Ergebnissen wurden die Bezeichnungen *reoM* (regulator of MurA degradation) für *Imo1503* und *reoY* für *Imo1921* eingeführt.

3.2 Charakterisierung der *gpsB*-Suppressorgene *reoM* (*Imo1503*) und *reoY* (*Imo1921*)

3.2.1 ClpCP-abhängige Akkumulation von MurA in den Δ *reoM*- und Δ *reoY*-Mutanten

Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben führte die Deletion von *reoM* und *reoY* zur Akkumulation von MurA. Eine Erhöhung der MurA-Menge durch die Deletion von *clpC* und *murZ* wurde bereits von Rismondo *et al.* 2017 gezeigt. Während durch die Deletion von *clpC* der Protease-Komplex der MurA-Degradation inaktiviert wird, wird für die Erhöhung der MurA-Menge in der Δ *murZ*-Mutante ein regulatorischer Mechanismus vermutet, der die Akkumulation von MurA in der Abwesenheit von MurZ begünstigt (Rismondo *et al.*, 2017). Dennoch konnte für ClpC und MurZ mit Hilfe von Epistasisexperimenten gezeigt werden, dass diese an dem gleichen Mechanismus beteiligt sind, da eine Δ *clpC* Δ *murZ*-Doppelmutante keine weitere Erhöhung der MurA-Menge im Vergleich zu den Einzelmутanten aufwies und somit keine additiven Effekte vorlagen (Rismondo *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Dieselbe Vorgehensweise wurde genutzt, um zu überprüfen, ob die Akkumulation in den Δ *reoM*- und Δ *reoY*-Mutanten ClpCP-abhängig ist und sich ReoM und ReoY somit demselben Mechanismus zuordnen lassen. Dazu wurden Δ *clpC* Δ *reoM*- (LMSW50) und Δ *clpC* Δ *reoY*-Doppelmutanten (LMSW51) generiert und mittels Western Blot auf die Akkumulation von MurA getestet (Abbildung 8, A). Wie im Fall der *murZ*-Deletion im Δ *clpC*-Hintergrund konnte auch für die zusätzlichen Deletionen von *reoM* und *reoY* im Δ *clpC*-Deletionsstamm kein weiterer Anstieg des MurA-Gehalts gegenüber den jeweiligen Einzelmутanten beobachtet werden. Das Ausbleiben additiver Effekte lässt vermuten, dass ReoM und ReoY als neue Faktoren der ClpCP-abhängigen Degradation von MurA aufzufassen sind.

Nach dem gleichen Prinzip wurde zudem überprüft, ob bei der Kombination der *murZ*-Deletion mit den Deletionen von *reoM* und *reoY* additive Effekte bei der MurA-Akkumulation beobachtet werden können. Dazu wurden die entsprechenden Doppelmutanten hergestellt und die MurA-Mengen in ihren Zellextrakten mittels Western Blot bestimmt (Abbildung 8, B). Auch in der Kombination der Deletionen von *reoM* und *reoY* mit einer *murZ*-Deletion ließ sich keine weitere Zunahme der MurA-Akkumulation gegenüber den drei Einzelmутanten feststellen. Diese Beobachtung ermöglicht die Schlussfolgerung, dass *murZ*, *reoM* und *reoY* dem gleichen, die MurA-Menge kontrollierenden Signalweg, zuzuordnen sind.

Die Vermutung, dass *reoM* und *reoY*, ebenso wie *clpC*, an der Kontrolle der proteolytischen Stabilität von MurA beteiligt sind, wurde durch ein weiteres Experiment bestätigt. Der Wildtyp

sowie die $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ - und $\Delta reoY$ -Mutanten wurden bis zu einer OD_{600} von $\sim 1,0$ kultiviert und anschließend die Proteinbiosynthese durch die Zugabe von $100 \mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol inhibiert. Anschließend wurde der Abbau von MurA und - zu Kontrollzwecken - von DivIVA über einen Zeitraum von 80 min verfolgt. Dabei wurde ersichtlich, dass MurA im Wildtyp über die Zeit fast vollständig degradiert wurde, während die DivIVA-Menge konstant blieb (Abbildung 8, C). Im Gegensatz dazu blieb der MurA-Gehalt in den $\Delta reoM$ - und $\Delta reoY$ -Mutanten genauso wie in dem $\Delta clpC$ -Stamm innerhalb dieser 80 min unverändert, sodass in diesen Stämmen keine MurA-Degradation nachgewiesen werden konnte. Damit sind $clpC$, $reoM$ und $reoY$ unter diesen Bedingungen offensichtlich gleichermaßen für den Abbau von MurA notwendig und es bestätigt sich die Vermutung, dass ReoM und ReoY eine essenzielle Rolle im ClpCP-abhängigen Abbau von MurA spielen.

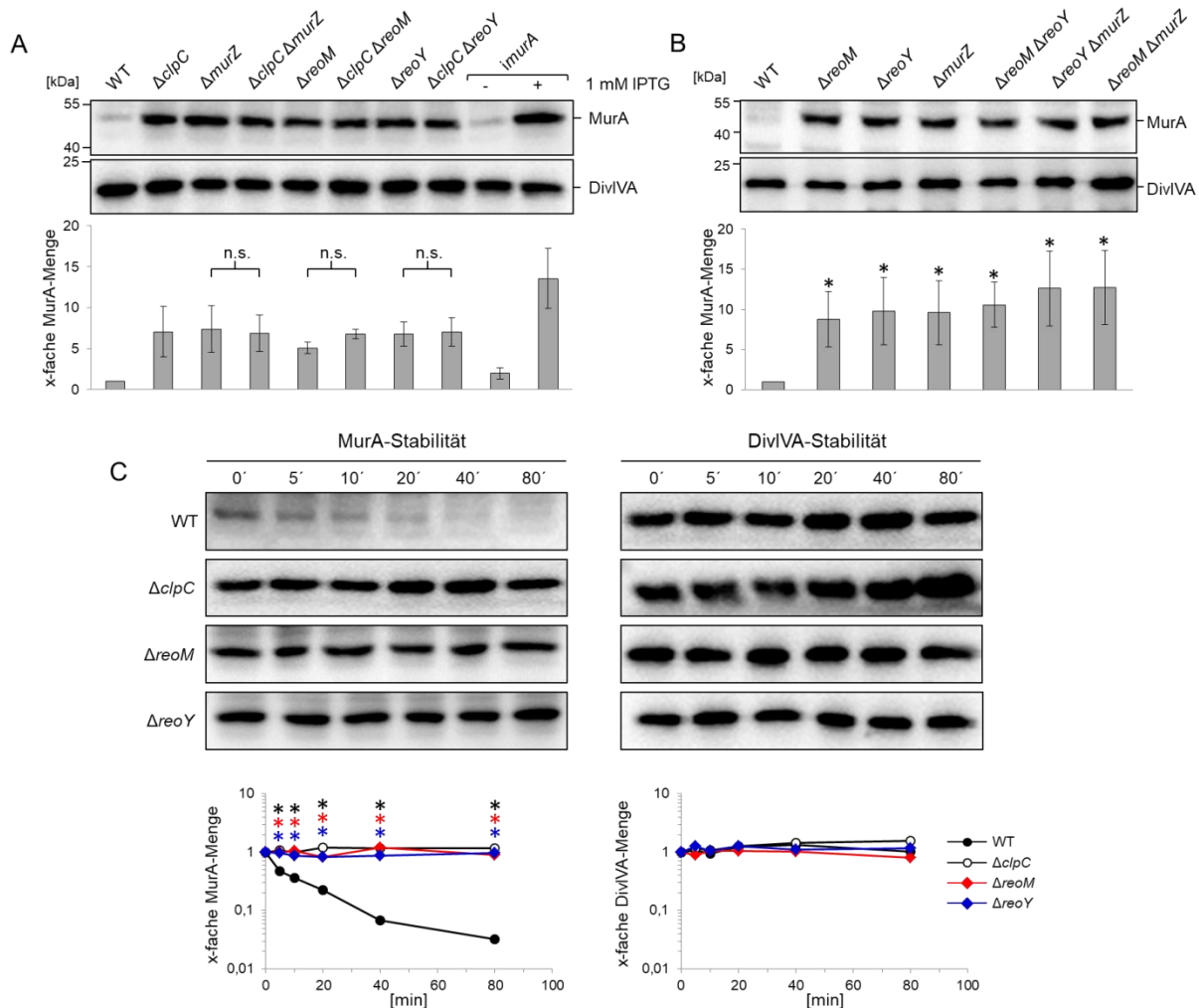


Abbildung 8: Effekt der Deletionen von $clpC$, $murZ$, $reoM$ und $reoY$ auf die MurA-Stabilität. (A) MurA-Mengen in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMJR138 ($\Delta clpC$), LMJR104 ($\Delta murZ$), LMJR171 ($\Delta clpC \Delta murZ$), LMSW30 ($\Delta reoM$), LMSW50 ($\Delta clpC \Delta reoM$), LMSW32 ($\Delta reoY$), LMSW51 ($\Delta clpC \Delta reoY$) und dem MurA-

Depletionsstamm LMJR123 (*imrA*) zur Kontrolle. Ein α -DivIVA Western Blot wurde parallel als Ladekontrolle mitgeführt. Die Quantifizierung der MurA-Mengen der Δ *reoM*- und Δ *reoY*- Einzel- sowie der Δ *clpC*-Doppelmutanten erfolgte mittels Densitometrie. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Signalintensitäten von drei unabhängigen Replikaten berechnet. Die nicht signifikanten Unterschiede zwischen den Einzel- und Doppelmutanten sind durch die Bezeichnung n.s. gekennzeichnet. (B) Test auf MurA-Akkumulation in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMSW30 (Δ *reoM*), LMSW32 (Δ *reoY*), LMJR104 (Δ *murZ*), LMSW117 (Δ *reoM* Δ *reoY*), LMSW118 (Δ *reoY* Δ *murZ*) und LMSW119 (Δ *reoM* Δ *murZ*). Die Quantifizierung der MurA-Mengen der Δ *reoM*- und Δ *reoY*-Einzel- sowie der Δ *murZ*-Doppelmutanten erfolgte durch die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Signalintensitäten aus drei unabhängigen Replikaten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp sind durch einen Stern gekennzeichnet ($P < 0,05$, *t*-Test). (C) Beobachtung der MurA-Degradation *in vivo* in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMJR138 (Δ *clpC*), LMSW30 (Δ *reoM*) und LMSW32 (Δ *reoY*). Die Stämme wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 in BHI-Medium kultiviert und anschließend die Proteinbiosynthese durch die Zugabe von Chloramphenicol [100 µg/ml] inhibiert. Der Abbau von MurA wurde über 80 min durch die Analyse der Proteinextrakte mittels Western Blot verfolgt (links). DivIVA unterliegt keinem proteolytischen Abbau und wurde als Kontrolle mitgeführt (rechts). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Replikaten bestimmt und signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet ($P < 0,05$, *t*-Test).

3.2.2 MurAA-Akkumulation in *B. subtilis*

Um die Konservierung der Funktion von ReoM und ReoY in der Kontrolle der proteolytischen Stabilität von MurA auch in anderen Gram-positiven Organismen zu testen, wurden die *B. subtilis*-Mutanten in *yrzL* (*reoM*) und *ypiB* (*reoY*) auf die Akkumulation von MurAA, dem MurA-Homologen von *B. subtilis* (Kock *et al.*, 2004), untersucht. Wie in *L. monocytogenes* führte die Deletion der entsprechenden Gene auch in *B. subtilis* zu einer etwa 12-fachen Erhöhung der MurAA-Menge im Vergleich zum Wildtyp und war damit ebenfalls vergleichbar mit der MurAA-Akkumulation in der *clpC*-Mutante, während die DivIVA-Menge in allen Stämmen konstant blieb (Abbildung 9, A). Demzufolge scheint die gleiche Funktion der homologen Proteine in *B. subtilis* konserviert zu sein. In *B. subtilis* sind weiterhin die Glutamin-Fructose-6-phosphat-Transaminase GlmS, welche an der Biosynthese von UDP-GlcNAc beteiligt ist, und die große Untereinheit der Acetolacetat-Synthase IlvB, welche für die Biosynthese von verzweigtkettigen Aminosäuren benötigt wird, als Substrate des ClpCP-Protease-Komplexes bekannt und akkumulieren bekanntermaßen in der Abwesenheit von ClpC in der Zelle (Gerth *et al.*, 2008). Mit GlmS- und IlvB-spezifischen Antiseren wurden die Proteinextrakte der *yrzL*- und *ypiB*-Mutante auf die Akkumulation der jeweiligen Proteine getestet. Wie in Abbildung 9 (B, C) ersichtlich ist, akkumulierten diese Proteine ebenfalls nach der Inaktivierung dieser beiden Gene. Dabei war die Akkumulation von GlmS nur 2-3-fach im Vergleich zum Wildtyp erhöht und die GlmS-Menge

in den Zellextrakten der *yrzL*-Mutante etwas geringer als in der *clpC*- und der *ypiB*-Mutante. Die IlvB-Menge war um das 5-8-fache gegenüber dem Wildtyp erhöht, wobei die Akkumulation von IlvB in den Zellextrakten der *clpC*-Mutante im Mittel am geringsten war. Demzufolge scheinen YrzL (ReoM) und YpiB (ReoY) wenigstens in *B. subtilis* an dem Abbau weiterer Substrate der ClpCP-Protease beteiligt zu sein und steuern somit nicht alleinig die MurAA-Degradation. Folglich sind ReoM und ReoY sehr wahrscheinlich generell am proteolytischen Abbau von ClpCP-Substraten beteiligt.

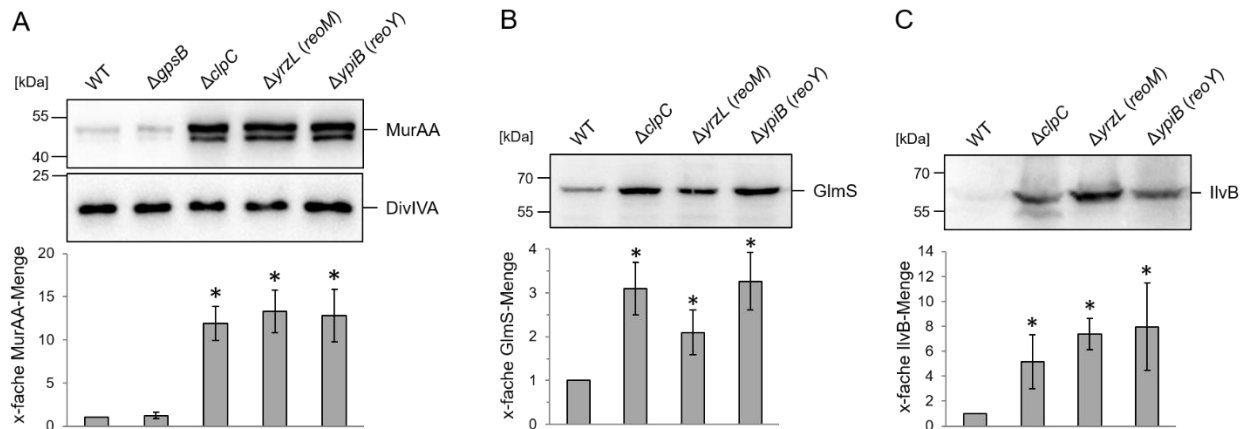


Abbildung 9: Effekt der Deletion von *yrzL* (*reoM*) und *ypiB* (*reoY*) auf die Akkumulation von Substraten der ClpCP-Protease in *B. subtilis*. (A) Effekt der Deletionen von *yrzL* (*reoM*), *ypiB* (*reoY*) und *clpC* auf die Menge von MurAA (A), GlmS (B) und IlvB (C) in den *B. subtilis*-Stämmen 168 (WT), $\Delta gpsB$, $\Delta clpC$, $\Delta yrzL$ und $\Delta ypiB$. Als Ladekontrolle wurde ein α -DivIVA Western Blot verwendet. Die Quantifizierung der Mengen der jeweiligen ClpCP-Substrate erfolgte über die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen der Signalintensitäten aus drei unabhängigen Western Blots. Die Werte, die sich signifikant vom Wildtyp unterschieden, wurden durch einen Stern gekennzeichnet ($P < 0,05$, *t*-Test).

3.2.3 Einfluss der MurA-Akkumulation auf die Peptidoglykanbiosynthese

Da MurA den ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese katalysiert, war anzunehmen, dass die Akkumulation von MurA in den $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Mutanten zu einer verstärkten Peptidoglykanbiosynthese beiträgt. Um dieses zu überprüfen, wurden diese vier Deletionsmutanten, sowie ein Stamm der neben dem chromosomalen *murA*-Allel noch eine IPTG-induzierbare ektopische Kopie des *murA*-Gens trägt (LMJR116), auf ihre Resistenz gegenüber dem Cephalosporin-Antibiotikum Ceftriaxon getestet. Zunächst wurde ein Agardiffusionstest mit 10 μ g/ml Ceftriaxon durchgeführt. In Abbildung 10 (A) sind die Hemmhofdurchmesser für die einzelnen Stämme dargestellt. Dabei wurde deutlich, dass die Überexpression von *murA* im Wildtyp-Hintergrund zu einer erhöhten Ceftriaxon-Resistenz im

Vergleich zum Wildtyp führte. In früheren Experimenten war bereits gezeigt worden, dass dieser Stamm in Gegenwart von IPTG MurA stark überproduziert (Rismondo *et al.*, 2017). Die Überproduktion von MurA ist also ausreichend, um die Peptidoglykanbiosynthese so zu stimulieren, dass sich dies in einer erhöhten Ceftriaxon-Resistenz manifestiert. Eine Erhöhung der Ceftriaxon-Resistenz wurde auch für die $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Mutanten beobachtet, welche einen verringerten Hemmhofdurchmesser aufwiesen.

Für eine eindeutigere Quantifizierung der Ceftriaxon-Resistenz wurde mit Hilfe von Ceftriaxon-Teststreifen (Konzentrationsgradient 0,016-256 $\mu\text{g/ml}$) die minimale Hemmkonzentration (MHK) der einzelnen Mutanten bestimmt. Der Wildtyp besaß eine MHK von 8 $\mu\text{g/ml}$, welche durch die Überexpression von *murA* im Wildtyp-Hintergrund (Stamm LMJR116) verzehnfacht wurde (Abbildung 10, B). Die Depletion von *murA* in einem *imurA* Stamm (LMJR123) hingegen führte zu einer Herabsetzung der Ceftriaxon-Resistenz (MHK=1,5 $\mu\text{g/ml}$). Die Unterschiede in der Ceftriaxon-Resistenz lassen vermuten, dass ein direkter Zusammenhang zwischen den variierenden MurA-Mengen und der Produktion von Peptidoglykan besteht. Die Deletion von *clpC* bewirkte einen 12-fachen Anstieg der Antibiotikaresistenz und war damit vergleichbar mit dem Effekt der artifiziellen *murA*-Überexpression im Stamm LMJR116. Die MurA-Akkumulation in den $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Mutanten bewirkte eine mittlere Zunahme der Ceftriaxon-MHK, die 2-3-fach im Vergleich zum Wildtyp anstieg. Diese nur intermediäre Zunahme lässt sich durch das Vorhandensein einer funktionalen, aber deregulierten, ClpCP-Protease in diesen Stämmen erklären. Gleichzeitig unterstützt die Zunahme der Ceftriaxon-Resistenz in diesen drei Stämmen basierend auf der verstärkten Peptidoglykanbiosynthese durch die MurA-Akkumulation die Hypothese der Funktion von ReoM, ReoY und MurZ als Regulatoren der ClpCP-abhängigen MurA-Degradation.

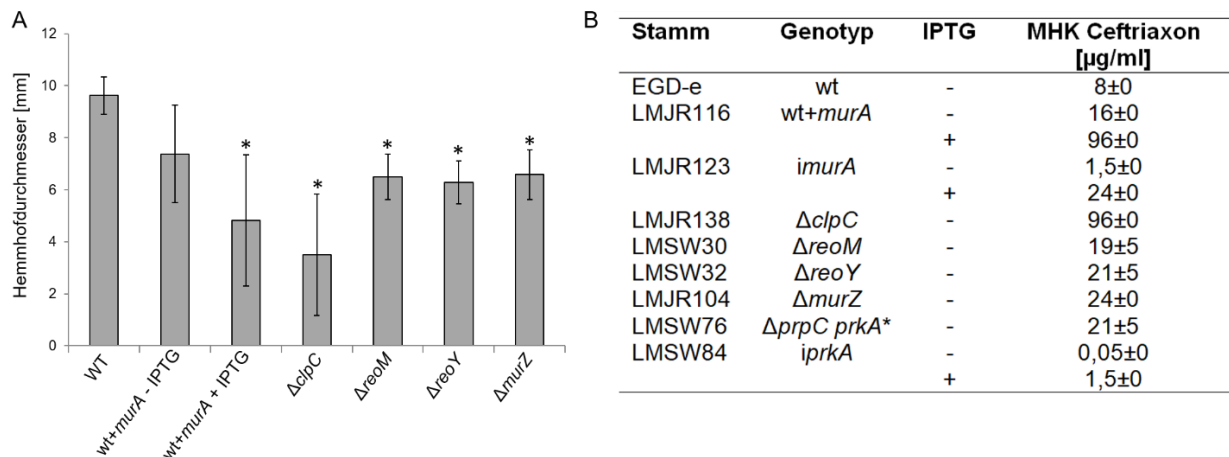


Abbildung 10: Einfluss der MurA-Akkumulation auf die Ceftriaxon-Resistenz. (A) Agardiffusionstest zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen der Akkumulation von MurA und der Resistenz gegenüber Ceftriaxon.

Dargestellt sind die Mittelwerte der vermessenen Hemmhofdurchmesser für die Stämme EGD-e (WT), LMJR116 (wt + *murA*), LMJR138 (Δ *clpC*), LMSW30 (Δ *reoM*), LMSW32 (Δ *reoY*) und LMJR104 (Δ *murZ*) aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikant vom Wildtyp abweichende Werte wurden mit einem Stern markiert ($P < 0,05$, *t*-Test). (B) Ceftriaxon-MHK von den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMJR116 (wt + *murA*), LMJR123 (*imrA*), LMJR138 (Δ *clpC*), LMSW30 (Δ *reoM*), LMSW32 (Δ *reoY*), LMJR104 (Δ *murZ*), LMSW76 (Δ *prpC prkA*^{*}) und LMSW84 (*iprA*). Die Bestimmung der MHK erfolgte mit Hilfe von Ceftriaxon-Teststreifen mit einem Konzentrationsgradienten von 0,016-256 µg/ml. Die ermittelten MHK-Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Replikaten.

Neben der erhöhten Ceftriaxon-Resistenz durch die Stimulation der Peptidoglykanbiosynthese infolge der MurA-Akkumulation in der Δ *reoM*-, Δ *reoY*-, Δ *murZ*- und Δ *clpC*-Mutante, wurden diese Stämme noch auf weitere physiologische Effekte der Gendeletionen untersucht. Wie in Abbildung 11 gezeigt wird, hatte die Deletion von *reoM*, *reoY* und *murZ* keinen Einfluss auf das Wachstum der Stämme in BHI-Medium bei 37°C (Abbildung 11, A). Für die Δ *clpC*-Mutante konnte ein leichter Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp bei 37°C beobachtet werden (Abbildung 11, A). Bei der Kultivierung der Δ *reoM*-, Δ *reoY*-, Δ *murZ*- und der Δ *clpC*-Mutante unter Zugabe von 5% NaCl zeigten sich jedoch eindeutige Unterschiede im Vergleich zum Wachstumsverhalten des Wildtyps. Unter Salzstress erreichte der Wildtyp erst nach etwa 10 h die stationäre Phase und eine maximale OD₆₀₀ von 0,5, während dieser ohne die Zugabe von Natriumchlorid bereits nach 7-8 h die maximale OD₆₀₀ von 0,7 erreichte. Die Δ *reoY*- und die Δ *murZ*-Mutante zeigten einen leichten Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp durch die Zugabe von 5% NaCl und wuchsen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Für die Δ *reoM*- und die Δ *clpC*-Mutante wurde unter Salzstress verglichen mit dem Wildtyp ein deutlich langsames Wachstum beobachtet und die maximale OD₆₀₀ war mit 0,3 deutlich unterhalb der des Wildtyps (Abbildung 11, B). Für die Δ *clpC*-Mutanten aus *B. subtilis* und *L. monocytogenes* war bereits eine Empfindlichkeit gegenüber Salzstress beschrieben worden (Krüger *et al.*, 1994; Rouquette *et al.*, 1996), sodass dieser Phänotyp auch für den in dieser Arbeit verwendeten *L. monocytogenes* Δ *clpC*-Deletionsstamm unter den gewählten Bedingungen bestätigt werden konnte. Die Deletion von *reoM* führte zu einem Phänotyp, welcher vergleichbar mit dem der reinen Δ *clpC*-Mutante war, wohingegen die Δ *reoY*- und die Δ *murZ*-Mutanten nur eine leichte Beeinträchtigung des Wachstumsverhaltens zeigten und damit kein klassischer Δ *clpC*-Phänotyp vorlag. Somit konnten in diesem Experiment erstmals Unterschiede zwischen der Δ *reoM*-Mutante und den Δ *reoY*- und Δ *murZ*-Deletionsstämmen beobachtet werden.

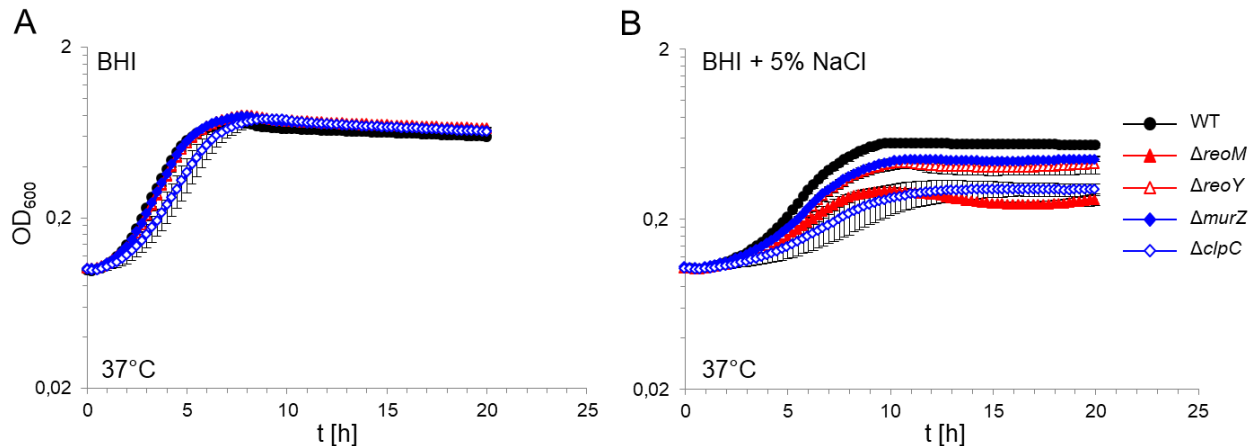


Abbildung 11: Effekt der Deletion von *reoM*, *reoY*, *murZ* und *clpC* auf das Wachstum bei Salzstress. Wachstum der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMSW30 ($\Delta reoM$), LMSW32 ($\Delta reoY$), LMJR104 ($\Delta murZ$) und LMJR138 ($\Delta clpC$) bei 37°C in BHI-Medium (A) und BHI-Medium mit 5% NaCl (B). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Replikaten bestimmt.

3.2.4 Überexpression und Reinigung von ReoM-Strep

Für biochemische Untersuchungen und die Generierung eines ReoM-Antiserums wurde ReoM-Strep überexprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt. Die erhaltenen Wasch- und Elutionsfraktionen (WF, EF) sowie eine Probe des Durchflusses wurden anschließend über eine SDS-PAGE (15%) aufgetrennt und die Proteine durch eine kolloidale Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Das ReoM-Monomer hat eine Größe von 10,5 kDa und wurde bereits in den Waschfraktionen detektiert. Dieses ließ vermuten, dass die Kapazität der Säule nicht ausreichend war, um das gesamte exprimierte Strep-Tag-Fusionsprotein zu binden, wodurch dieses mit den restlichen, nicht gebundenen Proteinen aus der Säule gewaschen wurde. In den Elutionsfraktionen konnte eine Bande bei etwa 11 kDa beobachtet werden, welche der Größe des ReoM-Monomers entsprach. Dabei waren keine bis sehr schwache Nebenbanden sichtbar, sodass ein hoher Reinheitsgrad vorlag (Abbildung 12, A). Das gereinigte ReoM wurde für die Generierung eines Antiserums im Kaninchen verwendet. Das erhaltene Antiserum besitzt jedoch eine sehr geringe Sensitivität, sodass lediglich das gereinigte Protein nachgewiesen werden kann und ist somit nicht für den Nachweis von ReoM in den Zellextrakten geeignet (Abbildung 12, B).

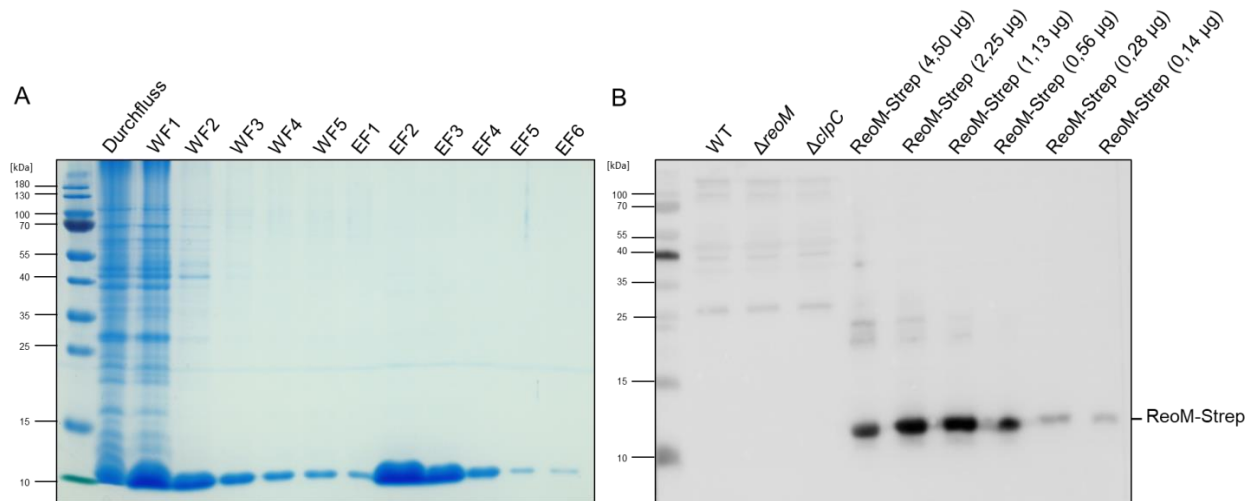


Abbildung 12: SDS-PAGE der Wasch- und Elutionsfraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung von ReoM-Strep. (A) Auftrennung der Proben aus dem Durchfluss, den Waschfraktionen (WF) 1-5 und den Elutionsfraktionen (EF) 1-6 in einem 15%igen Polyacrylamid-Gel. Das ca. 11 kDa große ReoM-Monomer konnte in den Wasch- und Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. (B) Test des ReoM-Antiserums. Der Western Blot zeigt die Zellextrakte der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMSW30 (Δ reoM) und LMJR138 (Δ clpC) sowie verschiedene Mengen des gereinigten ReoM-Strep-Fusionsproteins.

3.2.5 Die Kristallstruktur von ReoM

In Kollaboration mit Richard Lewis und Zoe Rutter von der Newcastle University konnte die Struktur von ReoM bei einer maximalen Auflösung von 1,6 Å erhalten werden. Für das molekulare Replacement wurde die Struktur von IreB, einem kleinen Phosphoprotein aus *Enterococcus faecalis* (Hall *et al.*, 2013) verwendet, wobei die Sequenzen mit einer Sequenzidentität von 60% auf Proteinebene übereinstimmen (Abbildung 13, A). ReoM ist ein globuläres Protein, welches aus vier normalen α -Helices besteht und einer einfach-gewundenen 3_{10} -Helix zwischen den Aminosäureresten 52 und 54 (Abbildung 13, B). Die einzelnen α -Helices sind über kurze Loops miteinander verbunden. ReoM bildet Homodimere, wobei die Helices $\alpha 2$ und $\alpha 4$ der Protomere die Hauptschnittstellen des Homodimers bilden. Sowohl in IreB als auch in ReoM gibt es am N-Terminus einen flexiblen, in der Struktur nicht aufgelösten Bereich, welcher die Phosphorylierungsstellen Thr4 und Thr7 beinhaltet. IreB aus *E. faecalis* ist ein Substrat von IreK, einer Serin/Threonin-Kinase, welche eine PASTA-Domäne besitzt (Hall *et al.*, 2013). Zoe Rutter zeigte mittels einer nicht-denaturierenden PAGE und LC/MS-Untersuchungen, dass ReoM von dem korrespondierenden Kinase-/Phosphatase-Paar PrkA (Lmo1820) und PrpC (Lmo1821) in *L. monocytogenes* *in vitro* phosphoryliert und dephosphoryliert wird (Wamp *et al.*, 2020).

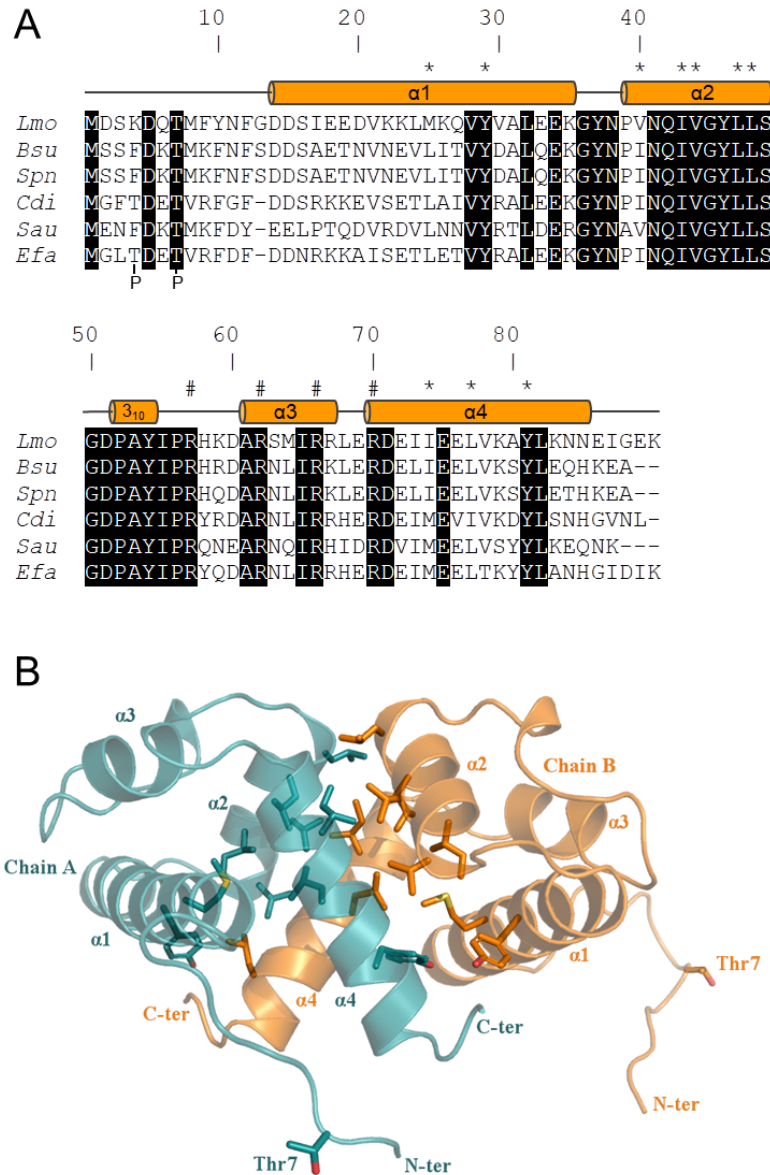


Abbildung 13: Sequenzalignment und Kristallstruktur von ReoM. (A) Sequenzvergleich von IreB aus *Enterococcus faecalis* (*Efa*) mit ReoM aus *L. monocytogenes* (*Lmo*) und weiteren Homologen in anderen Gram-positiven Organismen wie *Bacillus subtilis* (*Bsu*), *Streptococcus pneumoniae* (*Spn*), *Clostridium difficile* (*Cdi*) und *Staphylococcus aureus* (*Sau*). Konservierte Aminosäuren innerhalb der Sequenzen sind schwarz hinterlegt. Die Zuordnung der Nummern der Aminosäuren erfolgte ausgehend von der Phosphorylierung an Thr7 in *L. monocytogenes* ReoM. Die Phosphorylierung an Thr7 sowie die zusätzliche Phosphorylierungsstelle Thr4 in IreB sind hervorgehoben. Die Sekundärstrukturelemente wurden als Zylinder oberhalb der Proteinsequenz dargestellt. Die Aminosäuren, welche sich an der Grenzfläche zwischen den Monomeren befinden, sind durch einen Stern markiert. (B) Ribbon-Diagramm der Quartärstruktur des ReoM-Dimers. Die Sekundärstrukturelemente der einzelnen Protomere (türkise und orange Farbgebung) sind durch die Bezeichnung $\alpha 1$ - $\alpha 4$ entsprechend der Reihenfolge in der Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Die Phosphorylierungsstelle Thr7 sowie die Aminosäurereste an der Grenzfläche zwischen den Monomeren sind im Stick-Modell dargestellt.

3.2.6 Die Phosphorylierung von ReoM ist essenziell

Über LC/MS- und MS/MS-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Aminosäurerest Threonin 7 von ReoM durch PrkA phosphoryliert wird und die einzige Phosphorylierungsstelle darstellt (Wamp *et al.*, 2020). Durch Phosphoproteom-Daten konnte bestätigt werden, dass die Phosphorylierung von ReoM (Lmo1503) auch *in vivo* erfolgt (Misra *et al.*, 2011). Um den Effekt der Phosphorylierung *in vivo* untersuchen zu können, sollte Thr7 einerseits durch eine nicht-phosphorylierbare Aminosäure substituiert werden (phosphoablativ), welches den unphosphorylierten Zustand von ReoM darstellt. Der Austausch von Threonin 7 durch eine Aminosäure mit einer negativen Ladung, wie beispielsweise Glutamat (E) oder Aspartat (D), sollte andererseits die negative Ladung eines dauerhaft phosphorylierten ReoM simulieren. Eine solche Veränderung wird als phosphomimetische Substitution bezeichnet. Die phosphoablativ (T7A) und die phosphomimetische (T7D) Punktmutation wurde in ein IPTG-induzierbares *reoM*-Allel auf einem Plasmid eingebracht und in die Δ *reoM*-Mutante transformiert. Das Wachstumsverhalten der Stämme mit den jeweiligen Punktmutationen (LMSW52 [*ireoM* T7A], LMSW53 [*ireoM* T7D]), sowie dem nativen Allel (LMSW57 [*ireoM*]), wurde mit und ohne Zugabe von IPTG bei 37°C untersucht. Sowohl die Δ *reoM*- als auch die induzierbare *reoM*-Mutante (*ireoM*) zeigte mit und ohne Zugabe von IPTG keine Abweichungen vom Wildtyp-Wachstum. Die IPTG-induzierte Expression des *reoM* T7A- und des *reoM* T7D-Allels hingegen inhibierte das Wachstum der Stämme LMSW52 (*ireoM* T7A) und LMSW53 (*ireoM* T7D), während in der Abwesenheit von IPTG keine Wachstumsunterschiede zum Wildtyp vorlagen (Abbildung 14, A). Offensichtlich hat die Expression von ReoM T7A und ReoM T7D letale Effekte. Da bereits gezeigt wurde, dass ReoM Auswirkungen auf die MurA-Stabilität hat, wurden die MurA-Mengen in den Proteinextrakten der *ireoM* T7A- und *ireoM* T7D-Stämme bestimmt. Aufgrund des sehr geringen Wachstums der Stämme LMSW52 (*ireoM* T7A) und LMSW53 (*ireoM* T7D) in der Gegenwart von IPTG, wurden diese Stämme sowie der *ireoM*-Stamm (LMSW57) zunächst in BHI-Medium angezogen bis eine OD₆₀₀ von ~0,2 erreicht wurde. Anschließend wurde die Expression der ektopischen Allele durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Zellen nach einer Kultivierung von 2 h geerntet (OD₆₀₀~0,7). Durch die Quantifizierung der MurA-Level wurde ersichtlich, dass die zelluläre MurA-Menge in den *reoM*-Punktmutanten in der Gegenwart von IPTG im Vergleich zum MurA-Gehalt des Wildtyps um etwa 90% reduziert war. Bei der Kultivierung ohne IPTG war eine Akkumulation von MurA zu beobachten, welche den MurA-Mengen in der Δ *clpC*- und der reinen Δ *reoM*-Mutante entsprach (Abbildung 14, C). Damit scheint die Phosphorylierung von ReoM an Thr7 essenziell für die Lebensfähigkeit von *L. monocytogenes* zu sein, da diese die Stabilität des essenziellen MurA-Proteins beeinflusst.

Wenn die fehlende Phosphorylierung von ReoM in der *ireoM T7A*-Mutante zu einer Reduktion der MurA-Menge führt, hätte die Expression der *reoM T7D*-Mutation, welche den phosphorylierten Zustand von ReoM darstellen sollte, gegenläufige Resultate liefern sollen. In Übereinstimmung mit dieser abweichenden Beobachtung finden sich in der Literatur häufiger auch andere phosphomimetische Mutationen, die nicht den nativen Phosphorylierungszustand simulieren können (Dephoure *et al.*, 2013; Hunter, 2012). Zusätzlich konnte auch bereits für die phosphomimetische T7E-Substitution in dem ReoM-Homolog IreB aus *E. faecalis* gezeigt werden, dass IreB T7E nicht die gleiche Funktion wie IreB im phosphorylierten Zustand besitzt (Hall *et al.*, 2013). Aufgrund dessen wurde davon ausgegangen, dass die *reoM T7D*-Mutation keinen klassischen phosphomimetischen Effekt erzeugt und wahrscheinlich lediglich den Phänotyp einer nicht-phosphorylierbaren *reoM*-Mutation zeigt. Daher wurde in den meisten nachfolgenden Experimenten ausschließlich der *ireoM T7A*-Stamm verwendet.

Die Letalität der fehlenden Phosphorylierung wurde auch im Phänotyp der *ireoM T7A*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp ersichtlich, da die Zellform nicht aufrechterhalten werden konnte und die Zellen lysierten (Abbildung 14, B). Darüber hinaus zeigte der *ireoM T7A*-Stamm auch im Agardiffusionstest eine erhöhte Ceftriaxon-Empfindlichkeit in Gegenwart von IPTG in Form einer synergistischen Wachstumshemmung (Abbildung 14, D). Die Expression von ReoM T7A führte also zu einer Destabilisierung von MurA und in der Konsequenz zu einer Herabsetzung der Zellwandbiosynthese.

Die Phosphorylierung von ReoM zieht wahrscheinlich eine Konformationsänderung des N-Terminus von ReoM nach sich. Anhand der Kristallstruktur wurde vermutet, dass der flexible N-Terminus nach der Phosphorylierung Wechselwirkungen von Thr7~P mit konservierten, positiv-geladenen Aminosäuren auf der ReoM-Oberfläche eingeht, wo sich mehrere konservierte Arginine (Arg57, Arg62, Arg66, Arg70) befinden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden diese Arginine durch Alanin substituiert und in den $\Delta reoM$ -Hintergrund eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden auf ihre Wachstumsfähigkeit in der Gegenwart von IPTG getestet. Das Einbringen der *reoM R66A*- (LMSW120) und *reoM R70A*-Punktmutationen (LMSW121) hatte weder mit noch ohne Zugabe von IPTG einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme (Abbildung 14, E). Bei der Expression der *reoM R57A*- (LMSW125) und der *reoM R62A*-Mutation (LMSW126) waren die Stämme jedoch nicht mehr lebensfähig, wobei der Effekt vergleichbar mit dem der *reoM T7A*-Expression war (Abbildung 14, F). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Arg57 und Arg62 eine wichtige Rolle bei der Koordinierung der Konformationsänderung des flexiblen N-Terminus spielen und an Thr7-P binden könnten.

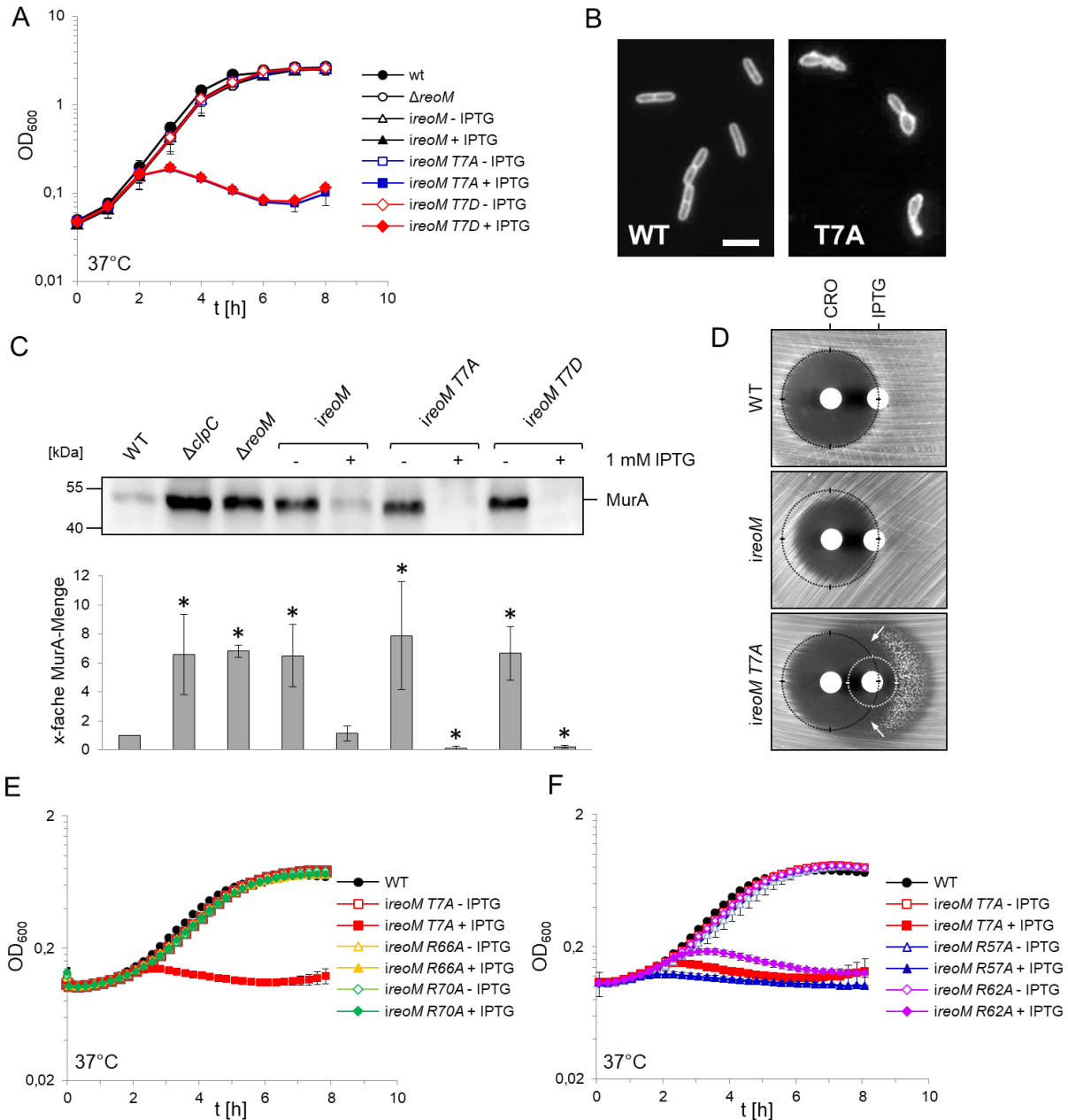


Abbildung 14: Effekt der *reoM*-Punktmutationen auf das Wachstum und die MurA-Stabilität. (A) Effekt der *reoM T7A*- und *T7D*-Punktmutationen auf das Wachstum von *L. monocytogenes*. Die Stämme EGD-e (WT), LMSW30 ($\Delta reoM$), LMSW57 (*ireoM*), LMSW52 (*ireoM T7A*) und LMSW53 (*ireoM T7D*) wurden in BHI-Medium mit und ohne Zugabe von IPTG bei 37°C kultiviert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei Experimenten ermittelt. (B) Effekt der *reoM T7A*-Punktmutation auf die Zellmorphologie. Die Stämme EGD-e (WT) und LMSW52 (*ireoM T7A*) wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in BHI-Medium unter Zugabe von IPTG kultiviert und die Zellen nach einer Membranfärbung mit Nilrot mikroskopiert. Der Maßstab beträgt 2 µm. (C) Effekt der *reoM T7A*- und *T7D*-Punktmutationen auf die Akkumulation von MurA. Die Stämme EGD-e (WT), LMSW30 ($\Delta reoM$), LMSW57 (*ireoM*), LMSW52 (*ireoM T7A*) und LMSW53 (*ireoM T7D*) wurden in BHI-Medium \pm IPTG angezogen, wobei die IPTG-Zugabe für die induzierbaren Stämme erst nach einer Kultivierungszeit von 2 h erfolgte,

um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten. Die Quantifizierung der MurA-Mengen erfolgte aus drei unabhängigen Replikaten densitometrisch mit Hilfe der ImageJ Software. Die Kennzeichnung mit einem Stern weist auf im Vergleich zum Wildtyp signifikante Unterschiede hin ($P < 0,05$, t -Test). (D) Die Expression der *reoM T7A*-Punktmutation bewirkte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ceftriaxon. Der Agardiffusionstest zeigte synergistische Effekte zwischen Ceftriaxon (CRO [50 mg/ml], rechts) und IPTG (1 mM, links), welche durch Pfeile gekennzeichnet sind. Die Kreise markieren den Inhibitionsbereich von Ceftriaxon (schwarz) und IPTG (weiß). (E) Effekt der *reoM R66A*- und *R70A*-Punktmutationen auf das Wachstum. Die Stämme EGD-e (WT), LMSW52 (*ireoM T7A*), LMSW120 (*ireoM R66A*) und LMSW121 (*ireoM R70A*) wurden in BHI-Medium \pm IPTG bei 37°C kultiviert. (F) Letalität der *reoM R57A*- und *R62A*-Punktmutationen. Die Anzucht der Stämme EGD-e, LMSW52 (*ireoM T7A*), LMSW125 (*ireoM R57A*) und LMSW126 (*ireoM R62A*) erfolgte mit und ohne Zugabe von 1 mM IPTG in BHI-Medium bei 37°C. Die Wachstumsexperimente wurden jeweils dreimal durchgeführt und die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

3.2.7 Suppression der Letalität der *reoM T7A*-Mutante

Eine mögliche Erklärung für die Letalität der *reoM T7A*-Punktmutation ist die verminderte MurA-Menge, weil MurA in *L. monocytogenes* essenziell ist (Rismondo *et al.*, 2017). Da MurA ein Substrat der ClpCP-Protease ist und ReoM einen neuen Faktor in der ClpCP-abhängigen MurA-Degradation darstellt, wurde getestet, ob die Phosphorylierung/Desphosphorylierung von ReoM an Thr7 die ClpCP-abhängige Degradation von MurA beeinflusst. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst *clpC* in der *ireoM T7A*-Mutante (LMSW52) und der *ireoM T7D*-Mutante (LMSW53) deletiert und die Stämme anschließend auf Wachstum und MurA-Akkumulation getestet. Dabei wurde ersichtlich, dass die Deletion von *clpC* die Letalität der konditionalen *reoM T7A/T7D*-Mutanten supprimiert, da die $\Delta clpC$ *ireoM T7A*-Mutante (LMSW74) und die $\Delta clpC$ *ireoM T7D*-Mutante (LMSW75) auch in der Anwesenheit von IPTG keinen Wachstumsdefekt aufwiesen (Abbildung 15, A). Darüber hinaus zeigten diese Stämme eine Akkumulation von MurA, die mit der der $\Delta clpC$ -Einzelmutante vergleichbar war (Abbildung 15, C). Somit korrigierte die Inaktivierung des ClpCP-abhängigen Abbaus von MurA den Effekt der Thr7-Substitution, welches die Hypothese unterstützt, dass die unphosphorylierte Form von ReoM die ClpCP-abhängige Degradation von MurA stimuliert.

Da nicht nur die Deletion von *clpC* zur Akkumulation von MurA führte, sondern auch die Deletion von *murZ* und *reoY*, wurde ebenfalls getestet, ob auch deren Deletionen die Letalität der *reoM T7A*-Mutation aufheben können. Wie Abbildung 15 (B) zeigt, bewirkte die Deletion der beiden Gene ebenfalls die Aufhebung des Wachstumsdefekts der *ireoM T7A*-Mutante (LMSW52) in der Anwesenheit von IPTG. Die Deletion beider Gene supprimiert also die Letalität der *reoM T7A*-Mutation und damit lassen sich sowohl ClpC als auch MurZ und ReoY als downstream von ReoM agierende Effektoren einordnen.

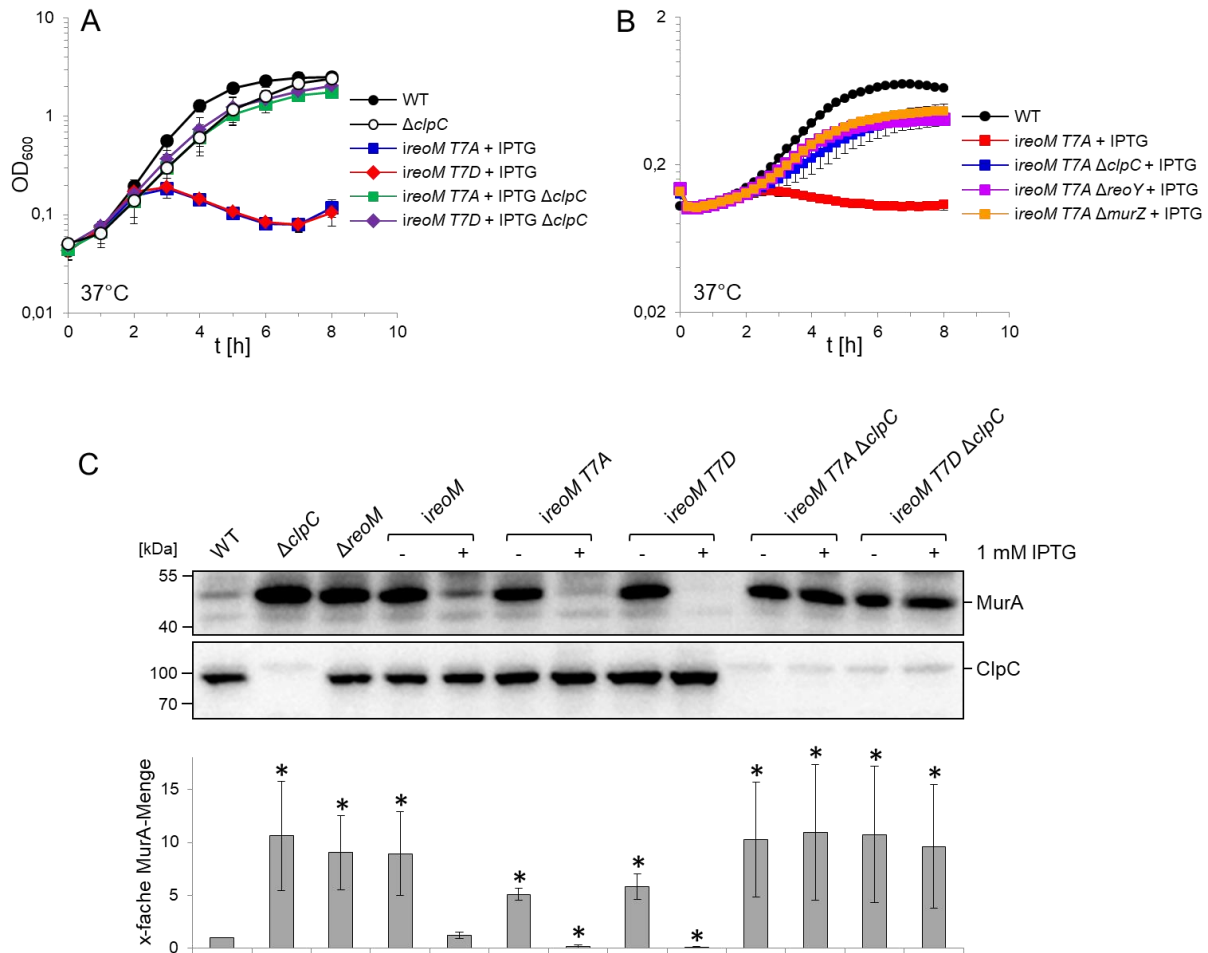


Abbildung 15: Suppression der Letalität der *reoM* T7A/T7D-Punktmutationen durch die Deletion von *clpC*, *reoY* und *murZ*. (A) Effekt der Deletion von *clpC* auf das Wachstum der *reoM* T7A- und *reoM* T7D-Punktmutanten. Die Stämme EGD-e (WT), LMJR138 ($\Delta clpC$), LMSW52 (*ireoM* T7A), LMSW53 (*ireoM* T7D), LMSW74 ($\Delta clpC$ *ireoM* T7A) und LMSW75 ($\Delta clpC$ *ireoM* T7D) wurden in BHI-Medium bei 37°C angezogen und auf Wachstum in der Gegenwart von IPTG getestet. (B) Effekt der Deletion von *reoY* und *murZ* auf das Wachstum der *reoM* T7A-Punktmutante. Die Kultivierung der Stämme EGD-e (WT), LMSW52 (*ireoM* T7A), LMSW74 (*ireoM* T7A $\Delta clpC$), LMSW123 (*ireoM* T7A $\Delta reoY$) und LMSW124 (*ireoM* T7A $\Delta murZ$) erfolgte in BHI-Medium bei 37°C unter Zugabe von IPTG. In (A) und (B) sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Wachstumsversuchen dargestellt. (C) Western Blots zur Bestimmung der MurA-Mengen in den Stämmen EGD-e (WT), LMJR138 ($\Delta clpC$), LMSW57 (*ireoM*), LMSW52 (*ireoM* T7A), LMSW53 (*ireoM* T7D), LMSW74 ($\Delta clpC$ *ireoM* T7A) und LMSW75 ($\Delta clpC$ *ireoM* T7D). Zur Quantifizierung wurden die Signalintensitäten densitometrisch bestimmt und anschließend die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Replikaten berechnet. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp wurden durch einen Stern gekennzeichnet ($P < 0,05$, *t*-Test). Ein α -ClpC Western Blot wurde als Ladekontrolle mitgeführt.

3.2.8 Effekt von PrkA und PrpC auf die MurA-Stabilität

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ReoM ein Substrat des Kinase-/Phosphatase-Paars PrkA/PrpC ist und der Phosphorylierungszustand von ReoM den ClpCP-abhängigen Abbau von MurA beeinflusst. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob das Kinase-/Phosphatase-Paar PrkA/PrpC in *L. monocytogenes* einen direkten Einfluss auf die MurA-Stabilität besitzt, wofür zunächst Deletionsmutanten in *prkA* (*lmo1820*) und *prpC* (*lmo1821*) generiert werden sollten. Die Deletion von *prkA* war im Wildtyp-Hintergrund jedoch gänzlich unmöglich und in *prpC*-Deletionsversuchen wurde erst nach mehreren Versuchen lediglich ein einzelner Klon mit einer *prpC*-Deletion erhalten. Die Genomsequenzierung dieses Stamms (LMSW76) zeigte, dass neben der *prpC*-Deletion noch eine zusätzliche Deletion der Aminosäure Gly18 in *prkA* vorlag (*prkA**). Gly18 liegt in einem Glycin-reichen Loop, der für die ATP-Bindung wichtig ist (Rakette *et al.*, 2012) und somit möglicherweise die Aktivität der Kinase herabsetzt und eine Anpassung an das Fehlen der Phosphatase darstellt. Im nächsten Schritt wurden konditionale *prkA*- und *prpC*-Mutanten erstellt, indem zunächst das native Allel als IPTG-induzierbare Kopie in den Wildtyp eingebracht wurde und im Anschluss unter Zugabe von IPTG die Deletion der jeweiligen Gene im Chromosom vorgenommen wurde. Wie Abbildung 16 (A) zeigt, war das Wachstum der *iprkA*-Mutante (LMSW84) stark IPTG-abhängig, welches mit den Beobachtungen von Pensinger *et al.* 2016 übereinstimmt, dass es sich bei *prkA* um ein essenzielles Gen handelt. Die konditionale *iprpC*-Mutante (LMSW83) zeigte ein Wildtyp-ähnliches Wachstum mit und ohne Zugabe von IPTG, welches sich durch die Hintergrundaktivität des Promotors in der Abwesenheit von IPTG erklären lassen könnte. Die MurA-Mengen in den *prkA*- und *prpC*-Depletionsstämmen wurden erneut mittels Western Blot ermittelt und quantifiziert (Abbildung 16, B). Dabei war eine leichte Akkumulation von MurA in der $\Delta prpC$ *prkA**-Mutante (LMSW76) zu beobachten, während die Depletion von PrpC in der *iprpC*-Mutante (LMSW83) zu einer deutlich stärkeren MurA-Akkumulation führte. Im Gegensatz dazu konnte für den *prkA*-Depletionsstamm nahezu kein MurA mit Hilfe des Western Blots detektiert werden. Damit hat das Kinase-/Phosphatase-Paar PrkA/PrpC gegenläufige Effekte auf die MurA-Menge und unterstützt die Hypothese, dass ReoM in der phosphorylierten Form, die während der PrpC-Depletion vorherrscht, die Akkumulation von MurA begünstigt, während die unphosphorylierte Form von ReoM, wie sie während der PrkA-Depletion auftritt, den Abbau von MurA stimuliert. Wie in Kapitel 3.2.3 gezeigt führte die Erhöhung der MurA-Menge in den $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Deletionsstämmen zu einer Stimulation der Peptidoglykanbiosynthese, welches wiederum in einer erhöhten Ceftriaxon-Resistenz resultierte. Eine Zunahme der Ceftriaxon-Resistenz konnte auch infolge der MurA-Akkumulation in der

$\Delta prpC$ $prkA^*$ -Mutante (MHK = 21 $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zum Wildtyp (MHK = 8 $\mu\text{g/ml}$) beobachtet werden, während die stark verringerte MurA-Menge in dem $prkA$ -Depletionsstamm eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ceftriaxon bewirkte (MHK = 0,05 $\mu\text{g/ml}$) (Abbildung 10, B).

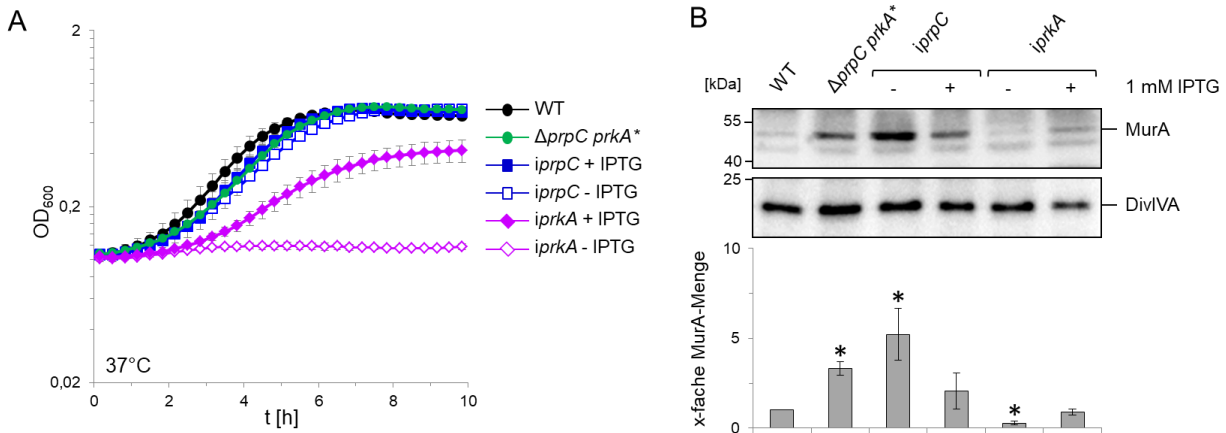


Abbildung 16: Effekt der PrkA- und PrpC-Depletion auf das Wachstum von *L. monocytogenes*. (A) Kultivierung der Stämme EGD-e (WT), LMSW76 ($\Delta prpC$ $prkA^*$), LMSW83 ($iprpC$) und LMSW84 ($iprkA$) mit und ohne Zugabe von IPTG bei 37°C in BHI-Medium. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Replikaten. (B) Effekt der PrkA- und PrpC-Depletion auf die MurA-Mengen. Aufgrund der IPTG-Abhängigkeit des $iprkA$ -Stamms wurde die Kultur zunächst 4 Stunden unter Zugabe von 1 mM IPTG angezogen, auf zwei Ansätze aufgeteilt und das Zellmaterial geerntet. Die Zellen wurden in der gleichen Menge BHI-Medium resuspendiert und einer der Ansätze mit 1 mM IPTG supplementiert. Beide Kulturen wurden für weitere 3,5 h bei 37°C ($OD_{600} \sim 1,0$) inkubiert. Die Western Blots zeigen die MurA- und DivIVA-Mengen in den Stämmen EGD-e (WT), LMSW76 ($\Delta prpC$ $prkA^*$), LMSW83 ($iprpC$) und LMSW84 ($iprkA$) \pm IPTG. Die Quantifizierung zeigt die durchschnittlichen MurA-Mengen aus drei Experimenten sowie die Standardabweichungen. Ein Stern kennzeichnet im Vergleich zum Wildtyp signifikante Unterschiede ($P < 0,05$, t -Test).

3.2.9 Der Einfluss der Deletion von *reoM*, *reoY* und *clpC* auf die *prkA*-Essenzialität

Während der Depletion von PrkA lässt sich das ebenfalls essenzielle MurA nur noch in geringen Mengen in den *L. monocytogenes*-Zellen nachweisen. Aufgrund dessen wurde angenommen, dass sich die Essenzialität von *prkA* durch eine gesteigerte Degradation von MurA, wie sie während der Depletion von PrkA beobachtet wird, erklären lassen könnte. Diese Hypothese sollte durch die Deletion von *reoM*, *reoY* und *clpC* in der $iprkA$ -Mutante getestet werden, da diese Gene am ClpCP-abhängigen Abbau von MurA beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden *clpC*, *reoM* und *reoY* im $iprkA$ -Hintergrund deletiert und die resultierenden Stämme $iprkA \Delta reoM$ (LMSW89), $iprkA \Delta reoY$ (LMSW90) und $iprkA \Delta clpC$ (LMSW91) auf ihr Wachstum in der An- und Abwesenheit von IPTG getestet. Wie in Abbildung 17 (A) ersichtlich ist, war das Wachstum

der jeweiligen Stämme IPTG-unabhängig, wohingegen die *iprkA*-Mutante (LMSW84) in der Abwesenheit von IPTG nicht lebensfähig war. Anhand der Western Blots war erkennbar, dass die Deletionen von *reoM*, *reoY* und *clpC* in der *iprkA*-Mutante zur Stabilisierung von MurA führten (Abbildung 17, B) und diese somit in den PrkA-depletierten Zellen an dem verstärkten Abbau von MurA beteiligt sein müssen.

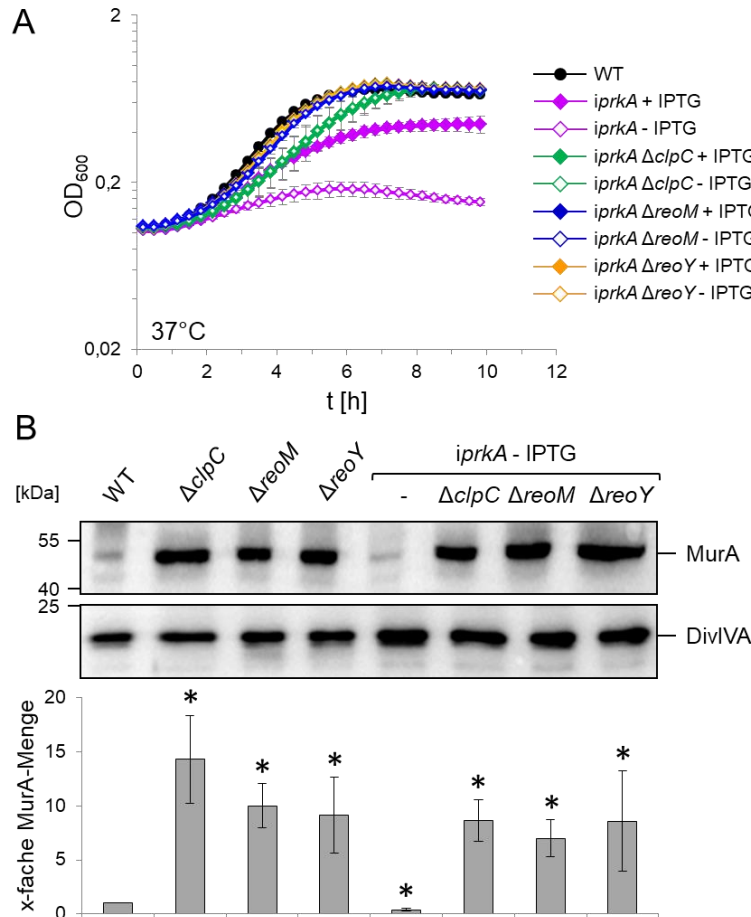


Abbildung 17: Suppression der *prkA*-Essenzialität durch die Deletion von *reoM*, *reoY* und *murZ*. (A) Wachstum der Stämme EGD-e (WT), LMSW84 (*iprkA*), LMSW89 (*iprkA* Δ *reoM*), LMSW90 (*iprkA* Δ *reoY*) und LMSW91 (*iprkA* Δ *clpC*) mit und ohne Zugabe von 1 mM IPTG in BHI-Medium bei 37°C. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten. (B) Effekt der Deletion von *reoM*, *reoY* und *murZ* in dem *iprkA*-Depletionsstamm auf die MurA-Akkumulation. MurA-Mengen in den Stämmen EGD-e (WT), LMSW84 (*iprkA*), LMSW89 (*iprkA* Δ *reoM*), LMSW90 (*iprkA* Δ *reoY*) und LMSW91 (*iprkA* Δ *clpC*) in der Abwesenheit von IPTG. Ein α -DivIVA Western Blot wurde als Ladekontrolle verwendet. Aus drei unabhängigen Replikaten wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der über Densitometrie ermittelten Signalintensitäten berechnet, wobei die Werte auf den Wildtyp normiert wurden. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp wurden durch einen Stern markiert ($P < 0,05$, *t*-Test).

3.2.10 Identifizierung weiterer *gpsB*-Suppressormutationen in *murA* und *prpC*

Im Rahmen des fortlaufenden Projektes wurden weitere *gpsB*-Suppressoren bei 42°C isoliert (Birgitt Hahn und Sven Halbedel, unveröffentlichte Ergebnisse). Durch eine Genomsequenzierung konnte gezeigt werden, dass ein Teil dieser Suppressorstämme Mutationen in *murA* und *prpC* tragen. Diese Suppressorstämme wurden bezüglich des Wachstums bei 37°C und 42°C analysiert und auf MurA-Akkumulation getestet. Alle Suppressorstämme zeigten bei 37°C und 42°C Wildtyp-ähnliches Wachstum, sodass eine vollständige Suppression des Hitze-sensitiven Δ *gpsB*-Phänotyps vorlag (Abbildung 18, A). Die Suppressorstämme *shg19* (*murA* S262L) und *shg21* (*murA* N197D) wiesen nur eine sehr geringe Erhöhung der MurA-Menge auf (Abbildung 18, C), obwohl für diese Art der Suppressoren eine stärkere Akkumulation von MurA zu erwarten gewesen wäre. Daher wurde vermutet, dass diese Punktmutationen zu einer erhöhten MurA-Aktivität beitragen oder MurA gegenüber der Degradation durch die ClpCP-Protease stabilisieren. Der Suppressorstamm *shg55*, welcher ein vorzeitiges Stoppcodon nach der 44. Aminosäure im *prpC*-Gen trägt, zeigte eine 6-fache Erhöhung der MurA-Menge im Vergleich zum Wildtyp und verhielt sich somit ähnlich zu einer Δ *clpC*-Mutante (8-9-fache MurA-Menge) (Abbildung 18, C). Um diese Beobachtung zu bestätigen und zu testen, ob die Deletion von *prpC* den Δ *gpsB*-Phänotyp supprimiert, wurde eine Δ *gpsB* Δ *prpC*-Doppelmutante generiert und das Wachstumsverhalten und der MurA-Gehalt untersucht. Das Wachstum des Δ *gpsB* Δ *prpC*-Stamms zeigte eine verzögerte, aber nahezu vollständige Suppression des Wachstumsdefekts der Δ *gpsB*-Mutante bei 42°C (Abbildung 18, D), welches sich ebenfalls durch die Akkumulation von MurA in diesem Stamm erklären lässt (Abbildung 18, E). Demzufolge ist auch *prpC* ein *gpsB*-Suppressorgen. Die zuvor dargestellten Ergebnisse suggerieren ein Modell, in dem PrkA und PrpC über die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von ReoM die ClpCP-abhängige MurA-Degradation steuern und somit die Synthese des Peptidoglykans regulieren. Ausgehend von der Regulation des letzten Schritts der Peptidoglykanbiosynthese durch GpsB konnte durch das Auffinden der *gpsB*-Suppressormutation in *prpC* ein direkter genetischer Zusammenhang zu dem ersten Schritt des Modells gezeigt werden, welches die Stimmigkeit des postulierten Mechanismus unterstützt.

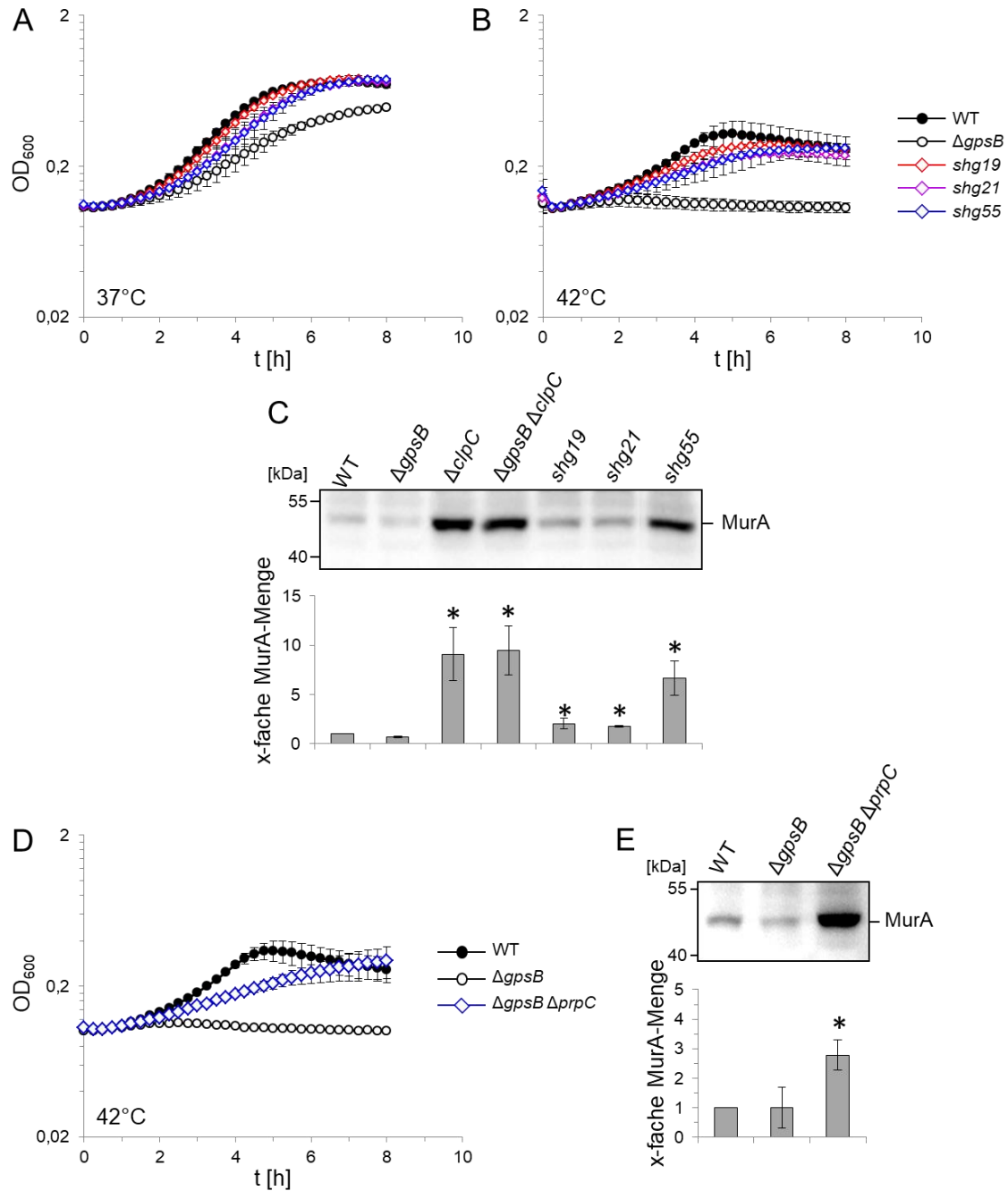


Abbildung 18: Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Mutationen in *murA* und *prpC*. (A, B) Wachstum der Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ($\Delta gpsB$), $shg19$ ($\Delta gpsB$ *murA* S262L), $shg21$ ($\Delta gpsB$ *murA* N197D) und $shg55$ ($\Delta gpsB$ *prpC*^{1-44aa}) bei 37°C (A) und 42°C (B) in BHI-Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Replikaten. (C) MurA-Akkumulation in den *gpsB*-Suppressorstämmen $shg19$ ($\Delta gpsB$ *murA* S262L), $shg21$ ($\Delta gpsB$ *murA* N197D) und $shg55$ ($\Delta gpsB$ *prpC*^{1-44aa}) sowie den Stämmen EGD-e (WT), LMJR138 ($\Delta clpC$) LMJR139 ($\Delta gpsB$ $\Delta clpC$). Mittels Densitometrie wurden die Signalintensitäten bestimmt und die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten berechnet. Durch einen Stern wurden signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp gekennzeichnet ($P < 0,05$, *t*-Test). (D) Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch die Deletion von *prpC*. Wachstum der Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ($\Delta gpsB$) und $\Delta gpsB \Delta prpC$.

LMSW135 ($\Delta gpsB \Delta prpC$) bei 42°C. Die Wachstumsversuche wurden dreimal durchgeführt und die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. (E) MurA-Mengen in den Stämmen EGD-e (WT), LMJR19 ($\Delta gpsB$) und LMSW135 ($\Delta gpsB \Delta prpC$). Die Mittelwerte der Signalintensitäten und die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Replikaten bestimmt. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp sind durch einen Stern markiert ($P < 0,05$, t -Test).

3.2.11 *In vivo* Protein-Protein-Interaktionen von ReoM, ReoY, MurA, ClpC und ClpP

Mit Hilfe eines Bacterial-Two-Hybrid-Experiments sollten die beobachteten genetischen Interaktionen von ReoM, ReoY, MurA, ClpC und ClpP auf Proteinebene bestätigt werden.

Dazu wurden die jeweiligen Proteine als Fusionsproteine mit dem T18- und dem T25-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* exprimiert. Dabei wurde jeweils ein T18-Fusionsprotein mit einem T25-Fusionsprotein in einen *E. coli cya* Stamm (BTH101) co-transformiert und auf selektiven Agarplatten ausgetropft. Die Kolonien, welche eine Blaufärbung aufwiesen, zeigten das Vorliegen einer Protein-Protein-Interaktion an, während bei weißen Kolonien keine Wechselwirkungen stattfanden. Abbildung 19 zeigt, dass alle Proteine mit sich selbst interagierten, wobei für die verschiedenen ClpC-Fusionen nur schwache Eigeninteraktionen vorlagen. Darüber hinaus gab es Wechselwirkungen zwischen MurA und ReoM, wobei ReoM außerdem mit ReoY interagierte. Weiterhin wurden Interaktionen von ReoY mit ClpC und ClpP beobachtet. Die *reoY*-T25-Fusion interagierte ebenfalls mit dem T18-Leervektor, sodass diese Fusion nicht funktional ist und die Interaktionen dieser Fusion für die Auswertung nicht berücksichtigt wurden. T18- und T25-Fusionen mit *murZ* erwiesen sich bereits in vorherigen Experimenten ebenfalls als nicht funktional. In Abbildung 19 (B) sind die genetischen und physikalischen Interaktionen vergleichend zusammengefasst. Durch die Untersuchung der phosphoablativen *reoM T7A*-Mutation konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von ReoM durch PrkA essenziell ist. Durch die Suppression der Letalität der *reoM T7A*-Mutation durch die Deletion von *reoY*, *murZ* und *clpC* konnten diese als downstream von ReoM agierende Komponenten eingeordnet werden. Basierend auf diesen Untersuchungen bildet das ClpCP-Substrat MurA vorerst das letzte Glied der Signaltransduktionskaskade. Die Protein-Protein-Interaktionen stellten ReoM in eine zentralere Position, da ReoM einerseits mit ReoY interagierte, welches wiederum Wechselwirkungen mit ClpCP aufwies, und zudem direkte Interaktionen mit MurA zeigte. Aufgrund dieser Daten scheinen ReoM und ReoY gemeinsam die Interaktion zwischen der ClpCP-Protease und dem Substrat MurA zu vermitteln. Diese beobachteten genetischen und physikalischen Interaktionen stehen nicht im Widerspruch

zueinander, aber geben auch keinen genaueren Aufschluss über den Mechanismus, über den ReoM, ReoY und MurZ die Regulation der ClpCP-abhängigen MurA-Degradation beeinflussen.

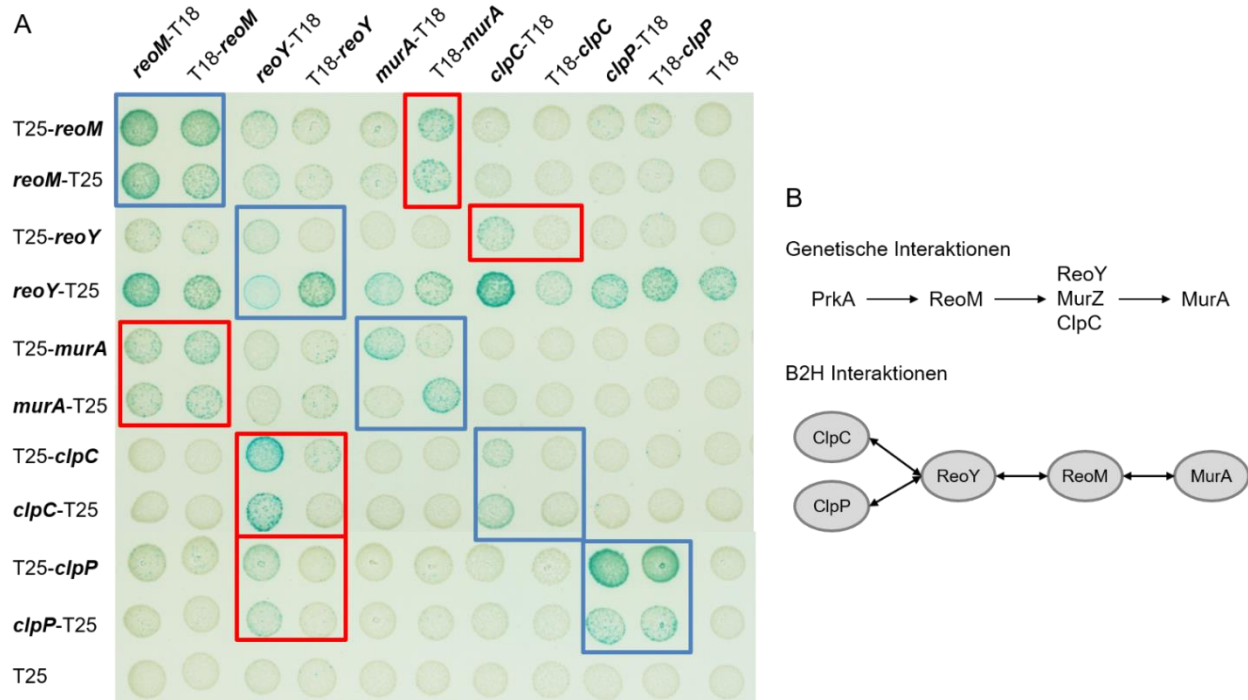


Abbildung 19: *In vivo* Protein-Protein-Interaktionen zwischen ReoM, ReoY, ClpC und ClpP. (A) ReoM, ReoY, MurA, ClpC und ClpP wurden innerhalb einer Co-Transformation als Fusion mit dem T18- und dem T25-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* exprimiert und durch Austropfen auf selektiven Agarplatten auf Protein-Protein-Interaktionen (Blaufärbung der Kolonien) untersucht. Durch einen blauen Kasten sind Selbstwechselwirkungen der Proteine gekennzeichnet. Die roten Kästen zeigen Wechselwirkungen verschiedener Interaktionspartner an. (B) Zusammenfassende Darstellung der beobachteten genetischen und physikalischen Wechselwirkungen. Die genetischen Untersuchungen zeigen die Essenzialität der ReoM-Phosphorylierung durch PrkA sowie die Suppression der Letalität der *reoM* T7A-Mutation durch die Deletion von *reoY*, *murZ* und *clpC*. Damit lassen sich ReoY, MurZ und ClpC downstream von ReoM einordnen und regulieren gemeinsam die Degradation von MurA. Das B2H-Experiment zeigte direkte Interaktionen von ReoM mit dem ClpCP-Substrat MurA und mit ReoY, welches wiederum mit dem Protease-Komplex ClpCP interagierte.

3.3 Charakterisierung des *gpsB*-Suppressorgens *lmo1549*

3.3.1 Komplementation des Zelllängenphänotyps der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante

Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben unterscheidet sich das während des Suppressorscreens identifizierte Gen *lmo1549* durch eine nicht vollständige Suppression des Hitze-sensitiven $\Delta gpsB$ -Phänotyps und der nicht vorhandenen Akkumulation von MurA von den anderen *gpsB*-Suppressorgen *reoM* (*lmo1503*) und *reoY* (*lmo1921*). Zudem zeigte die $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante einen Zellteilungsdefekt mit einer deutlich erhöhten Zelllänge ($1,7 \pm 0,9 \mu\text{m}$), welcher bei den anderen Doppelmutanten nicht beobachtet werden konnte. Um zu überprüfen, ob der Zellteilungsphänotyp auf die gemeinsame Deletion von *lmo1549* und *gpsB* zurückzuführen ist, wurden Komplementanten generiert, welche ektopisch entweder ein IPTG-induzierbares *lmo1549*- oder *gpsB*-Allel tragen, und die durchschnittliche Zelllänge in der Anwesenheit von IPTG bestimmt. Wie in Abbildung 20 dargestellt wurde, führte sowohl die Expression von *lmo1549* also auch die von *gpsB* im $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Hintergrund zu einer Komplementation des Zelllängenphänotyps, da diese Stämme unter Zugabe von IPTG wieder eine Zelllänge besaßen, welche mit der des Wildtyps vergleichbar war ($1,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$). Durch die Komplementation des Zelllängenphänotyps konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Zelllänge auf der gemeinsamen Deletion von *gpsB* und *lmo1549* beruht und nicht durch zusätzliche Mutationen in dem Stammhintergrund verursacht wird.

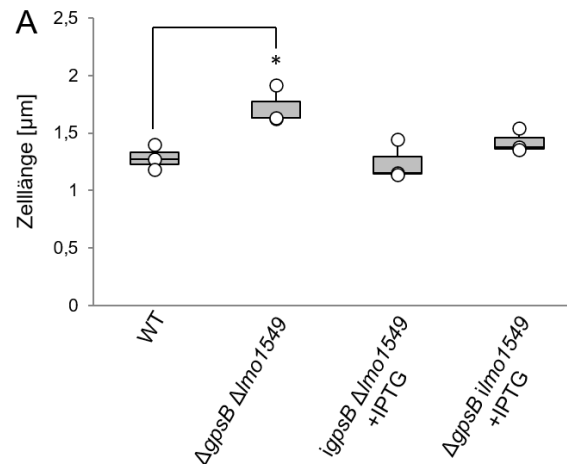


Abbildung 20: Komplementation des Zelllängenphänotyps der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante. (A) Mittlere Zelllänge der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR119 ($\Delta gpsB \Delta lmo1549$), LMSW60 (*lmo1549* $\Delta gpsB$) und LMSW66 ($\Delta gpsB$ *lmo1549*). Die Stämme wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase angezogen und die Zellmembran anschließend mit Nilrot gefärbt. Für jeden Stamm wurden 300 Zellen in drei unabhängigen Replikaten vermessen. Dargestellt sind die Mediane, welche aus den 300 bestimmten Zelllängen innerhalb eines Replikats berechnet wurden. Messwerte, die sich signifikant vom Wildtyp unterscheiden, wurden mit einem Stern gekennzeichnet ($P < 0,05$, *t*-Test).

3.3.2 Die Deletion von *lmo1549* im Vergleich mit bekannten Mechanismen der Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind drei Mechanismen zur Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps bekannt (Kapitel 1.3.5) und es wurde untersucht, ob sich die Deletion von *lmo1549* einem dieser Mechanismen zuordnen lässt.

Der erste Weg zur Wiederherstellung des Wachstums der Δ *gpsB*-Mutante bei 42°C erfolgt über die Inaktivierung von PBP A1, da es in der Abwesenheit von GpsB durch eine Fehlregulation von PBP A1 zum ineffizienten Einbau von Zellwandvorstufenmolekülen in die wachsende Peptidoglykankette kommt (Rismondo *et al.*, 2016; Rismondo *et al.*, 2017). Um zu überprüfen, ob *Lmo1549* die Funktionalität von PBP A1 beeinflusst, wurde das Wissen genutzt, dass die gleichzeitige Deletion beider Klasse A PBPs *pbpA1* und *pbpA2* in *L. monocytogenes* letal ist (Rismondo *et al.*, 2015). Dadurch wäre eine Δ *lmo1549* Δ *pbpA2*-Doppelmutante nicht lebensfähig, wenn das Fehlen von *Lmo1549* die Funktion von PBP A1 beeinträchtigt. Eine Δ *lmo1549* Δ *pbpA2*-Doppelmutante (LMSW35) konnte generiert werden und zeigte sowohl bei 37°C als auch bei 42°C kein vom Wildtyp abweichendes Wachstum (Abbildung 21 A, B). Demzufolge erfolgt die Suppression des Hitze-sensitiven Phänotyps in der Δ *gpsB* Δ *lmo1549*-Mutante nicht über die Inaktivierung von PBP A1.

Ein weiterer Mechanismus zur Aufhebung des Wachstumsdefekts der Δ *gpsB*-Mutante bei 42°C ist die Akkumulation der UDP-GlcNAc 1-carboxyvinyltransferase MurA, welche am ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese beteiligt ist (Rismondo *et al.*, 2017), wodurch der unkoordinierte Einbau der Zellwandintermediate durch eine an sich verstärkte Peptidoglykanbiosynthese kompensiert wird. Wie bereits in Kapitel 3.1.3 gezeigt, führte die Deletion von *lmo1549* jedoch weder in der Δ *lmo1549*-Einzelmutante noch in der Δ *gpsB* Δ *lmo1549*-Doppelmutante zu einer Erhöhung der MurA-Menge, während sich die MurA-Menge durch die Deletion von *clpC* etwa um das 8-fache steigerte (Abbildung 21, C).

Eine dritte Möglichkeit besteht über die Erhöhung der Menge des MurA-Substrats UDP-GlcNAc, durch die Inaktivierung anderer Enzyme, wie die Glykosyltransferasen GtcA und *Lmo2550*, welche UDP-GlcNAc für die Dekoration der Wandteichonsäuren (WTA) verwenden (Rismondo *et al.*, 2017; Rismondo *et al.*, 2018). Über eine Färbung der GlcNAc-Reste auf den Wandteichonsäuren mit dem an Weizenkeim-Agglutinin gekoppelten Farbstoff Alexa Fluor® 594 wurde auf eine intakte Glykosylierung der WTAs in den Deletionsmutanten getestet (durchgeführt von Jeanine Rismondo). Dabei wurde gezeigt, dass die GlcNAc-Reste in der Zellwand der Δ *lmo1549*-Mutante, ebenso wie im Wildtyp, durch den rotfluoreszierenden Farbstoff nachgewiesen werden konnten, während in einer Δ *gtcA*-*lmo2550*-Mutante die

Glykosylierung nicht mehr erfolgen konnte (Abbildung 21, D). Damit verläuft die Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps nicht über eine Inaktivierung der WTA-Glykosylierung und muss über einen neuen, vierten Mechanismus verlaufen.

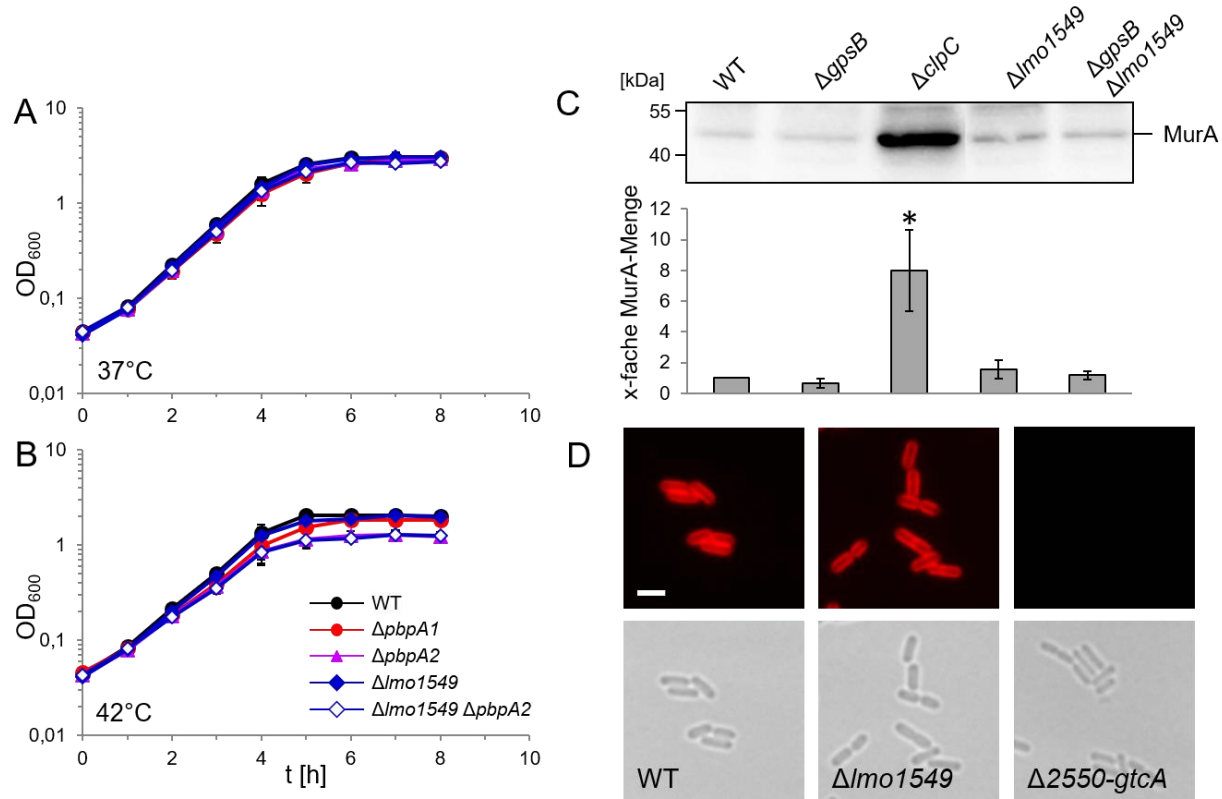


Abbildung 21: Vergleich der $\Delta lmo1549$ -Deletion mit bekannten Mechanismen der Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps. (A, B) Wachstum der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$), LMSW18 ($\Delta lmo1549$) und LMSW35 ($\Delta lmo1549 \Delta pbpA2$) bei 37°C (A) und 42°C (B) zum Test der Lebensfähigkeit der $\Delta lmo1549 \Delta pbpA2$ -Doppelmutante. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt und die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Darstellung verwendet. (C) MurA-Mengen in den Stämmen EGD-e, LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMSW18 ($\Delta lmo1549$) und LMJR119 ($\Delta gpsB \Delta lmo1549$). Der Stamm LMJR138 ($\Delta clpC$) wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Signalintensitäten aus drei unabhängigen Replikaten bestimmt. Werte, die signifikant vom MurA-Gehalt des Wildtyps abweichen, wurden durch einen Stern gekennzeichnet ($P < 0,05$, t -Test). (D) Färbung der GlcNAc-Reste auf den Wandteichonsäuren mit Hilfe des an Weizenkeim-Agglutinin gekoppelten Farbstoffs Alexa Fluor® 594. Die obere Reihe zeigt die Stämme EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta lmo1549$) und LMS201 ($\Delta lmo2550-gtcA$) nach der Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff. Als Kontrolle wurde der gleiche Bildausschnitt im Phasenkontrast in der unteren Reihe dargestellt (Maßstab: 2 µm).

3.3.3 Konservierte Lokalisation von *lmo1549* (*radC*) upstream von *mreB* (*lmo1548*)

Die vorläufige Annotation von *lmo1549* als *radC* beruht auf der Homologie von *lmo1549* mit dem RadC-Protein aus *E. coli*. Ein *E. coli radC102* Stamm wurde zunächst im Zusammenhang mit erhöhter UV- und Strahlungssensitivität beschrieben (Felzenszwalb *et al.*, 1984; Felzenszwalb *et al.*, 1992). Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass in dem verwendeten Stamm das *recG*-Gen eine Mutation trägt und für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist und keine Mutation in *radC* (Lombardo und Rosenberg, 2000). Um einen Zusammenhang von *lmo1549* zur UV- und Strahlungssensitivität auch in *L. monocytogenes* ausschließen zu können, wurden der Wildtyp-Stamm (EGD-e) und die $\Delta lmo1549$ -Mutante sowie die *E. coli*-Stämme *E. coli* C600 (K12) (UV-resistent) und Top10 (UV-sensitiv) in verschiedenen Verdünnungsstufen auf ihre UV-Sensitivität getestet (Abbildung 22, A). Dabei zeigte sich, dass die $\Delta lmo1549$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte UV-Empfindlichkeit aufwies, während *E. coli* Top10 im Vergleich zu *E. coli* C600 eine klar erkennbare UV-Sensitivität zeigte, sodass auch für *L. monocytogenes* eine mögliche Funktion von *lmo1549* als DNA-Reparatur-Protein ausgeschlossen werden kann.

Durch einen Sequenzvergleich wurde gezeigt, dass *lmo1549* und *lmo1549*-Homologe in anderen Bakterienspezies upstream des *mreBCD* Operons lokalisiert sind (Abbildung 22, B). Aufgrund der konservierten Lokalisation von *lmo1549* upstream des Aktin-homologen *mreB*-Gens, welches an der Aufrechterhaltung der Zellform und der Zellelongation beteiligt ist (Errington und Wu, 2017), wurde überprüft, ob *lmo1549* ebenfalls eine Funktion in der Stäbchenbildung in *L. monocytogenes* besitzt. Um die Phänotypen einer $\Delta mreB$ - und einer $\Delta lmo1549$ -Mutante vergleichen zu können, wurde versucht eine $\Delta mreB$ -Mutante zu generieren. Dieses war jedoch nur nach Einbringen eines ektopischen *mreB*-Allels in der Gegenwart von IPTG möglich. Das Wachstum des erhaltenen *mreB*-Depletionsstamms (LMSW49) war stark IPTG-abhängig und in der Abwesenheit von IPTG bildeten sich unmittelbar Suppressoren (Daten nicht gezeigt). Um diesen Effekt zu umgehen, wurde der vermutete kokkoide Phänotyp des *mreB*-Depletionsstamms durch die Zugabe von 0,3 M Saccharose in die Agarplatten osmotisch stabilisiert. Durch die MreB-Depletion wurden die zunächst Stäbchen-förmigen Bakterien kokkoid, ein Effekt, der in der $\Delta lmo1549$ -Mutante nicht auftrat (Abbildung 22, D). Die Depletion von MreB wurde mit Hilfe eines α -MreB Western Blots bestätigt (Abbildung 22, C). Da *lmo1549* nicht an der Stäbchenbildung in *L. monocytogenes* beteiligt ist, kann ein funktionaler Zusammenhang zwischen *mreB* und *lmo1549* ausgeschlossen werden.

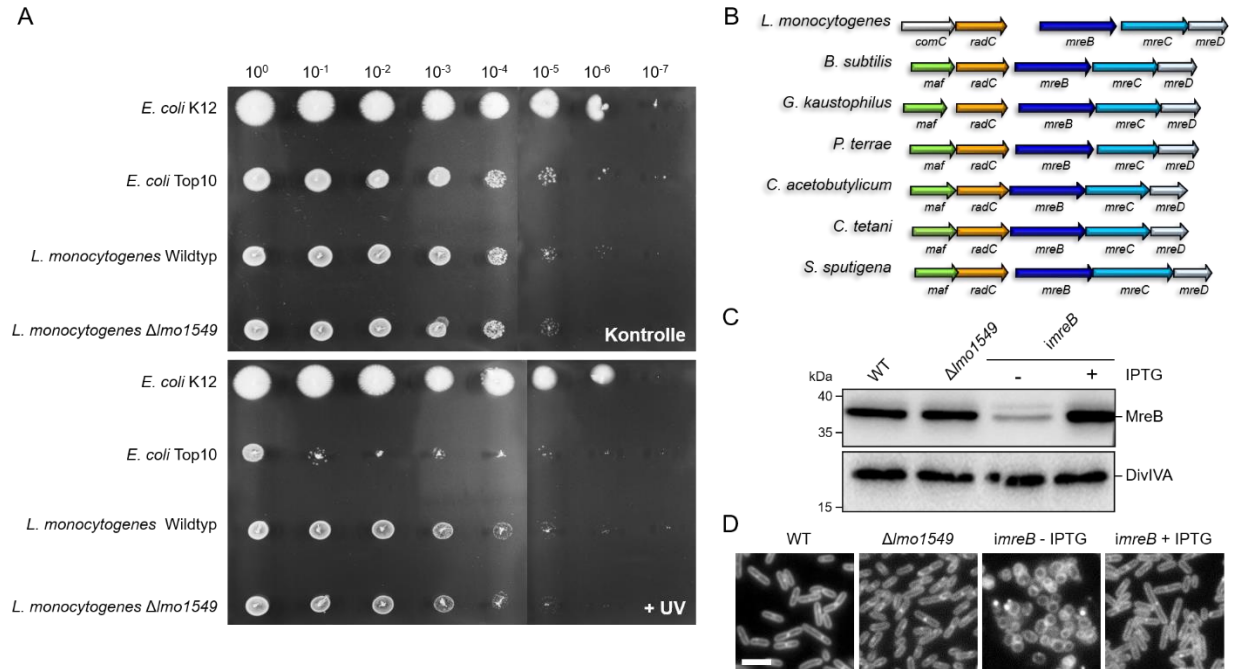


Abbildung 22: Chromosomale Lokalisation von *lmo1549* upstream des *mreBCD*-Operons und die Annotation als *radC*. (A) Test der *lmo1549* (*radC*)-Deletionsmutante auf UV-Sensitivität. Die *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e und LMSW18 ($\Delta lmo1549$) wurden in einer Verdünnungsreihe auf BHI-Agarplatten ausgetropft und auf Wachstum nach UV-Behandlung getestet. Zum Vergleich wurde der UV-resistente Stamm *E. coli* C600 (K12) und der UV-empfindliche Stamm *E. coli* Top10 verwendet. Eine unbehandelte Platte wurde zur Kontrolle (oberer Teil der Abbildung) mitgeführt. (B) Schematische Darstellung der Gensequenz von Vertretern verschiedener Bakterienspezies wie den *Bacilli*, *Clostridia* und den *Selenomonadales* zeigt die konservierte Lokalisation von *lmo1549* (*radC*) und *lmo1549*-Homologen upstream von *mreBCD*. (C) Western Blot zum Nachweis von MreB- und DivIVA-Mengen in den Stämmen EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta lmo1549$) und LMSW49 (*imreB*) bestätigt die Depletion von MreB in der Abwesenheit von IPTG. (D) Fluoreszenzmikroskopie der Membranfärbung der Stämme EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta lmo1549$) und LMSW49 (*imreB*) mit Nile rot nach der Anzucht auf BHI-Agarplatten supplementiert mit 0,3 M Sucrose \pm 1mM IPTG (Maßstab: 2 μ m).

3.3.4 Screening nach einer genetischen Interaktion von *Lmo1549* mit anderen Zellteilungsproteinen

Der Zellteilungsdefekt der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante sowie die konservierte Lokalisation upstream des *mreBCD*-Operons legt eine Funktion von *Lmo1549* in der Zellteilung nahe. Um eine mögliche Zuordnung zu einem Zellteilungsschritt zu ermöglichen, wurde die Deletion von *lmo1549* mit der Deletion früher und später Zellteilungsproteine in *L. monocytogenes* kombiniert und auf synthetisch kranke Phänotypen bezüglich des Wachstums, der Zellteilung und der Morphologie untersucht. In *L. monocytogenes* gibt es Homologe der fünf frühen

Zellteilungsproteine (FtsZ, FtsA, SepF, ZapA and EzrA) und der acht späten Zellteilungsproteine (PBP A1, FtsW, PBP B2, DivIB, DivIC, FtsL, GpsB and DivIVA) aus *B. subtilis* (Gamba *et al.*, 2009). Von den fünf frühen Zellteilungsproteinen waren nur die Deletionen von *sepF* und *zapA* erfolgreich. Die Deletionen von *ftsZ* und *ezrA* im $\Delta lmo1549$ -Hintergrund wurden aufgrund der vermuteten Essenzialität von *ftsZ* und der bestätigten Essenzialität von *ezrA* in *L. monocytogenes* nicht getestet (Considine *et al.*, 2011). Für die *zapA*- und *sepF*-Deletion im Wildtyp-Hintergrund konnte keine Veränderung in der Zellmorphologie beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch beim Wachstumsverhalten der $\Delta zapA$ - (LMLR9) und $\Delta sepF$ -Mutante (LMLR8) war bei 37°C kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp erkennbar. Lediglich bei 42°C zeigte die $\Delta sepF$ -Mutante einen leichten Wachstumsdefekt gegenüber dem Wildtyp. Die generierten $\Delta lmo1549 \Delta zapA$ - (LMSW58) und $\Delta lmo1549 \Delta sepF$ -Doppelmutanten (LMSW59) wiesen keine Unterschiede im Wachstum, der Zellteilung/Zelllänge oder der Morphologie im Vergleich zu den Einzelmutanten auf (Abbildung 23, A,B). Die $\Delta pbpA1$ -Einzelmutante (LMS57) hat im Vergleich zum Wildtyp eine größere mittlere Zelllänge und weist eine gebogene Zellmorphologie auf (Rismondo *et al.*, 2015). Der gleiche Phänotyp wurde für die $\Delta lmo1549 \Delta pbpA1$ -Mutante (LMSW36) beobachtet. Auch die $\Delta lmo1549 \Delta divIVA$ -Mutante (LMSW37) zeigte mit dem Ketten-bildenden Phänotyp den Phänotyp einer $\Delta divIVA$ -Einzelmutante (Halbedel *et al.*, 2012). Demzufolge konnten durch die Kombination der *lmo1549*-Deletion mit den Deletionen der späten Zellteilungsgene *pbpA1* und *divIVA* ebenfalls keine additiven Effekte zu den bereits vorhandenen Phänotypen der Einzelmutanten beobachtet werden. Die weiteren späten Zellteilungsgene wurden nicht getestet, da diese entweder in *L. monocytogenes* (*pbpB2*, *ftsW1*) essenziell sind (Rismondo *et al.*, 2015; Rismondo *et al.*, 2019) oder in *B. subtilis* (*divIB*, *divIC*, *ftsL*) als essenziell beschrieben wurden (Beall und Lutkenhaus, 1989; Levin und Losick, 1994; Daniel *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2003). Damit konnten keine genetischen Interaktionen von *lmo1549* mit den getesteten frühen und späten Zellteilungsgenen identifiziert werden.

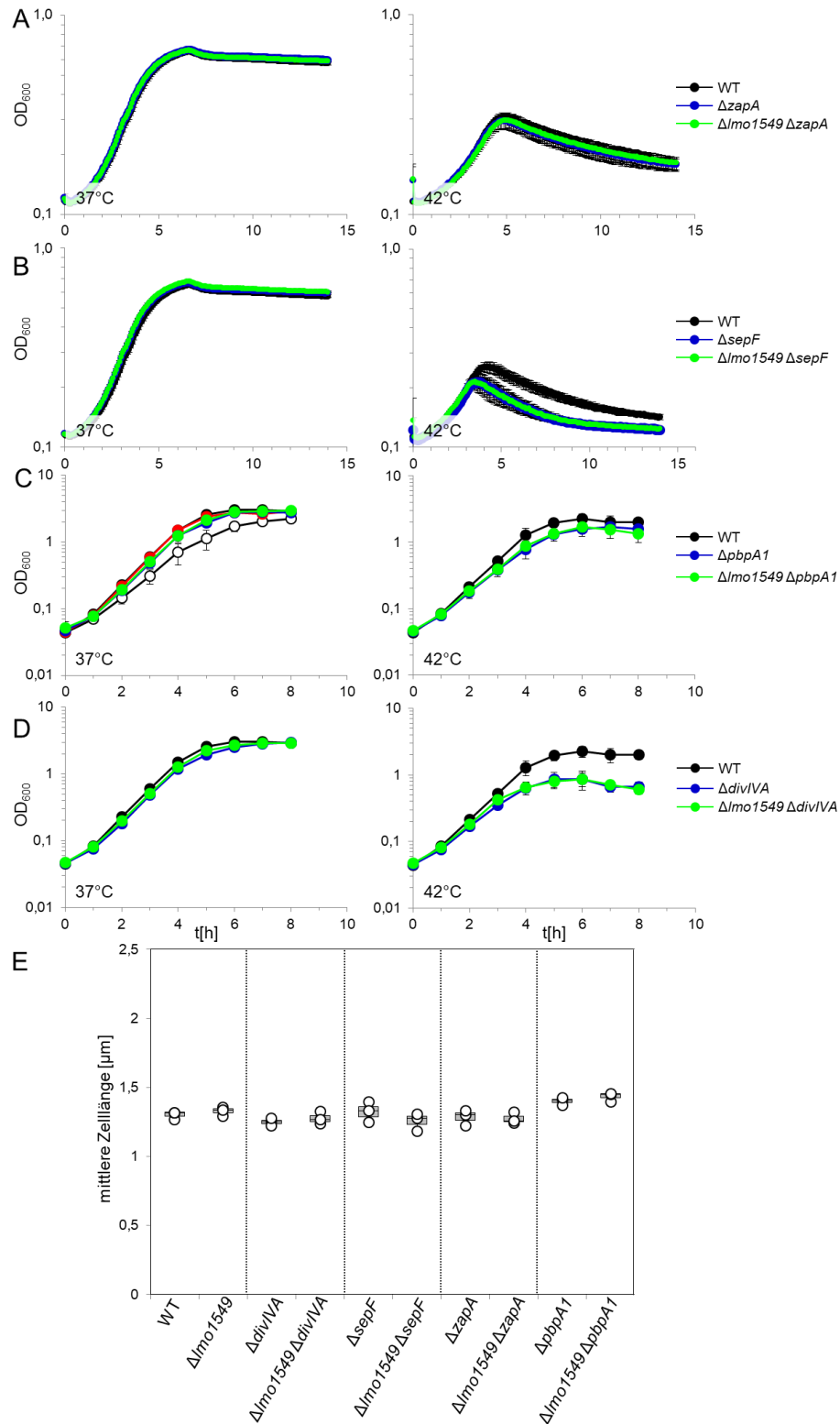


Abbildung 23: Test der Deletion von *lmo1549* auf genetische Interaktionen mit anderen Zellteilungsgenen.

Wachstumsverhalten der Stämme EDG-e und (A) LMLR9 ($\Delta zapA$) und LMSW58 ($\Delta lmo1549 \Delta zapA$), (B) LMLR8 ($\Delta sepF$) und LMSW59 ($\Delta lmo1549 \Delta sepF$), (C) LMS57 ($\Delta pbbA1$) und LMSW36 ($\Delta lmo1549 \Delta pbbA1$) und (D) LMS2

($\Delta divIVA$) und LMSW37 ($\Delta Imo1549 \Delta divIVA$). Die Stämme wurden in BHI-Medium bei 37°C und 42°C kultiviert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Wachstumsversuchen. (E) Mittlere Zelllängen der oben genannten Einzel- und $\Delta Imo1549$ -Doppelmutanten. Die Stämme wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in BHI-Medium bei 37°C angezogen und nach einer Membranfärbung mit Nilrot mikroskopiert. Innerhalb eines Replikats wurden 300 Zellen pro Stamm vermessen und der Median der Verteilung bestimmt. Die Medianwerte aus drei unabhängigen Replikaten sind dargestellt.

3.3.5 Interaktion von Lmo1549 mit den Proteinen des Min-Systems

In einem nächsten Ansatz wurde die Deletion von *Imo1549* mit der Deletion von weiteren Genen kombiniert, welche ebenfalls mit der Zellteilung assoziiert sind. Das Min-System ist für die korrekte Platzierung des Z-Rings während der Zellteilung verantwortlich und besteht in *L. monocytogenes* aus den drei Komponenten MinC, MinD und MinJ (Levin *et al.*, 1992; Marston *et al.*, 1998; Marston und Errington, 1999; Bramkamp *et al.*, 2008; van Baarle und Bramkamp, 2010; Kaval *et al.*, 2014). Die entsprechenden $\Delta Imo1549 \Delta minC$ - (LMSW68), $\Delta Imo1549 \Delta minCD$ - (LMSW65) und $\Delta Imo1549 \Delta minJ$ -Mutanten (LMSW69) wurden generiert und das Wachstumsverhalten bei 37°C und 42°C mit dem der jeweiligen Einzelmутanten verglichen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede im Wachstum zwischen den Einzel- und Doppelmutanten für die Kombination der *Imo1549*-Deletion mit den Deletionen von *minC* und *minJ* (Abbildung A2). Die $\Delta Imo1549 \Delta minCD$ -Mutante erreichte jedoch bei 42°C bereits nach 4 h ihre maximale optische Dichte, wohingegen die $\Delta Imo1549$ -Mutante und die $\Delta minCD$ -Mutante erst nach 5-6 h in die stationäre Wachstumsphase übergingen und eine höhere optische Dichte erreichten (Abbildung 24 A, B). Demzufolge besteht eine genetische Interaktion zwischen der Deletion von *Imo1549* und der *minCD*-Deletion. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurden die Zelllängen der Einzel- und Doppelmutanten vermessen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Abweichungen zwischen den Zelllängen der *minC*- und *minCD*-Mutanten und den Mutanten mit zusätzlicher *Imo1549*-Deletion (Abbildung A3). In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen hat die $\Delta minJ$ -Mutante im Gegensatz zu den $\Delta minC$ - und $\Delta minCD$ -Mutanten keinen klassischen Min-Phänotyp mit einer größeren Zelllänge, sondern besitzt eine Zelllänge vergleichbar mit der des Wildtyps (1,25 µm) (Kaval *et al.*, 2014). In der Kombination mit der Deletion von *Imo1549* hingegen betrug die mittlere Zelllänge jedoch 1,42 µm und unterschied sich damit signifikant von der Zelllänge der jeweiligen Einzelmутanten (Abbildung 24 C, D). Dieses weist auf eine Interaktion von *Imo1549* mit *minJ* hin.

Im nächsten Schritt wurden die Komponenten des Min-Systems und Lmo1549 auf physikalische Interaktionen mit Hilfe des BACTH-Systems getestet. Dazu wurden ihre Gene als

Fusionsprodukte mit dem T18- und dem T25-Fragment der katalytischen Domäne der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* in einer Co-Transformation exprimiert und durch eine Blaufärbung der Kolonien *in vivo*-Interaktionspartner identifiziert. Lmo1549 zeigte dabei weder Interaktionen mit sich selbst noch mit den Proteinen des Min-Systems. Durch ein Programm zur Vorhersage von Proteindomänen wurden in Lmo1549 zwei Domänen identifiziert, welche die Aminosäuren 1-100 und 100-224 umfassten (Jeanine Rismondo, Doktorarbeit, 2016). Die einzelnen Lmo1549-Domänen wurden ebenfalls auf Protein-Protein-Interaktionen mit den Komponenten des Min-Systems getestet. Dabei wies die N-terminale Domäne mit den Aminosäuren 1-100 Wechselwirkungen mit sich selbst und mit MinC auf, wohingegen das C-terminale Lmo1549-Fragment (aa100-224) weder mit sich selbst noch mit den Proteinen des Min-Systems interagierte (Abbildung 24, E). Lmo1549 hat also offensichtlich die Fähigkeit mit MinC zu interagieren. Insgesamt zeigte sich damit, dass Lmo1549 und die Komponenten des Min-Systems sowohl auf genetischer als auch auf physikalischer Ebene miteinander in funktionaler Beziehung stehen.

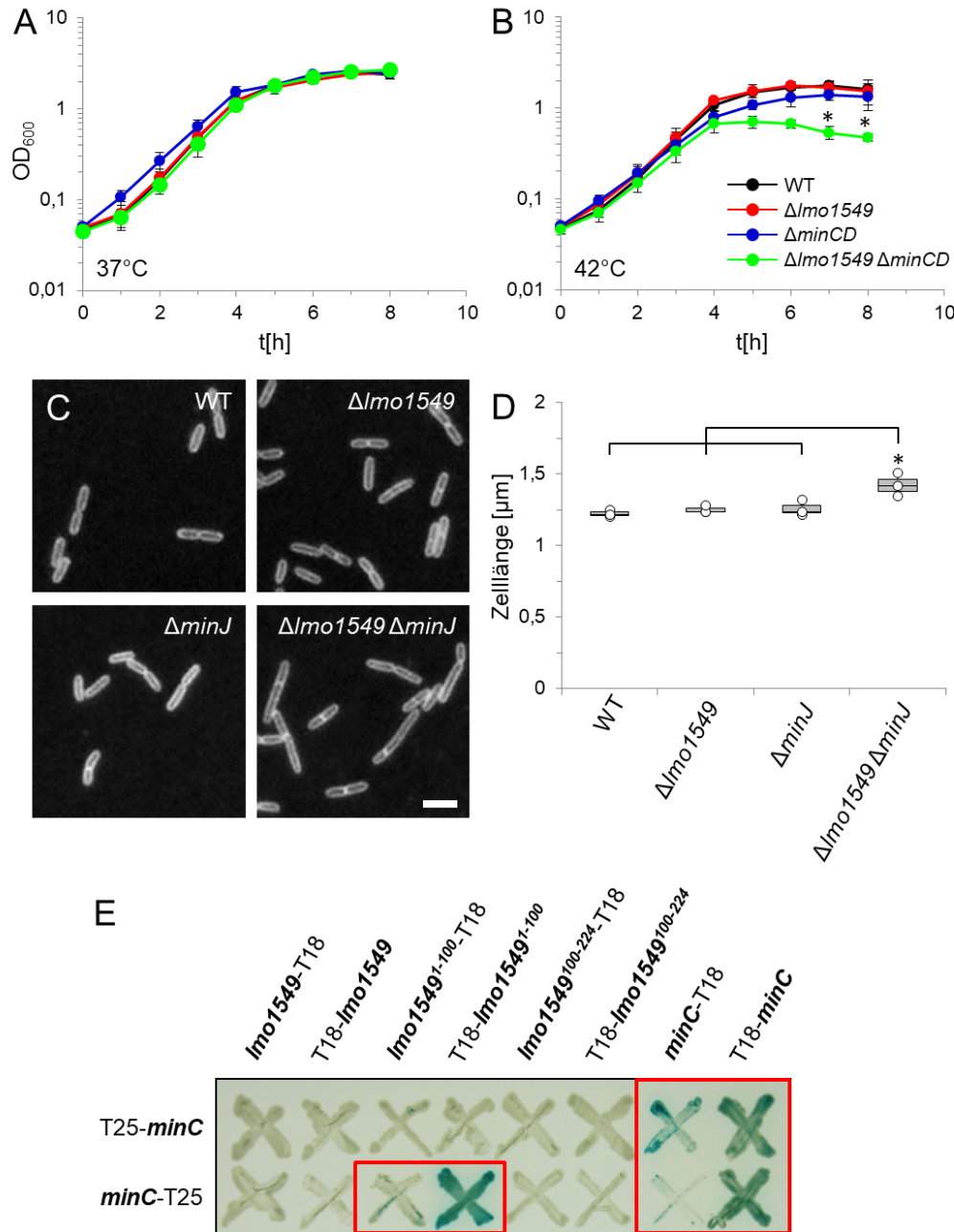


Abbildung 24: Genetische und physikalische Interaktion von *Imo1549* mit den Komponenten des Min-Systems. (A, B) Wachstumsdefekt der $\Delta Imo1549 \Delta minCD$ -Doppelmутante bei 42°C. Wachstum der Stämme EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta Imo1549$), LMKK35 ($\Delta minCD$) und LMSW65 ($\Delta Imo1549 \Delta minCD$) bei 37°C (A) und 42°C (B). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Wachstumsversuchen bestimmt und signifikante Abweichungen vom Wildtyp durch einen Stern gekennzeichnet ($P < 0,05$, t -Test). (C) Fluoreszenzmikroskopie der Stämme EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta Imo1549$), LMS120 ($\Delta minJ$) und LMSW69 ($\Delta Imo1549 \Delta minJ$) nach einer Anzucht bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase und anschließender Membranfärbung mit Nilrot. (D) Zelllängenvermessung der Stämme EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta Imo1549$), LMS120 ($\Delta minJ$) und LMSW69 ($\Delta Imo1549 \Delta minJ$) nach einer Membranfärbung und anschließender Fluoreszenzmikroskopie. Pro Replik wurden 300 Zellen je Stamm vermessen und der Median der Längenverteilung bestimmt. Im Boxplot

dargestellt sind die Mediane aus drei unabhängigen Experimenten. Der Stern markiert signifikante Unterschiede zur Zelllänge des Wildtyps ($P < 0,05$, t -Test). (E) Bacterial-Two-Hybrid-Experiment zur Bestimmung von *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen zwischen Lmo1549, den verkürzten Lmo1549-Fragmenten (aa1-100, aa100-224), welche den vorhergesagten Proteindomänen entsprechen, und MinC.

3.3.6 Interaktion von GpsB mit den Komponenten des Min-Systems

Lmo1549 wurde als partieller Suppressor des Hitze-sensitiven Δ *gpsB*-Phänotyps identifiziert und die Δ *gpsB* Δ *lmo1549*-Doppelmutante hat einen Zellteilungsphänotyp. Ein Screening nach genetischen und physikalischen Interaktionen von Lmo1549 mit anderen Zellteilungsproteinen zeigte einen Zusammenhang mit den Komponenten des Min-Systems. Aufgrund dessen wurde im Folgenden überprüft, ob auch genetische und physikalische Interaktionen zwischen GpsB und den Proteinen des Min-Systems bestehen. Dazu wurden zunächst die Δ *gpsB* Δ *minCD*- (LMSW86) und Δ *gpsB* Δ *minJ*- (LMSW85) Mutanten hergestellt. Ein Δ *gpsB* Δ *minC*-Stamm konnte nicht generiert werden. Zudem war der Δ *gpsB* Δ *minCD*-Stamm genetisch instabil, sodass sich beim Ausstrich auf BHI-Agarplatten bei 37°C Suppressoren bildeten. Demzufolge wurde ein *gpsB*-Depletionsstamm verwendet, welcher neben der Deletion von *gpsB* ektopisch ein IPTG-induzierbares *gpsB*-Allel (LMS56) trägt, und die Deletion von *minCD* und *minJ* in diesem genetischen Hintergrund durchgeführt. Für die resultierenden Stämme LMSW133 (*igpsB* Δ *minCD*) und LMSW132 (*igpsB* Δ *minJ*) wurde das Wachstumsverhalten bei 37°C und 42°C mit und ohne Zugabe von IPTG getestet (Abbildung 25, A). Die Depletion von GpsB im Δ *minJ*-Hintergrund führte zu einem leichten Wachstumsdefekt bei 37°C, der in etwa dem der Δ *gpsB*-Einzelmutante entsprach. Ein stärkerer Wachstumsnachteil als bei der Δ *gpsB*-Einzelmutante wurde für die Depletion von GpsB im Δ *minCD*-Hintergrund beobachtet, sodass in diesem Fall additive Effekte der einzelnen Deletionen/Depletionen vorlagen. Bei 42°C ist die Depletion von GpsB in beiden Stämmen dominant gegenüber den Deletionen von *minCD* und *minJ*, da kein Wachstum möglich war. Trotz der Zugabe von IPTG konnten bei 42°C beide Depletionsstämme nicht die maximale optische Dichte der Δ *minCD*- und Δ *minJ*-Mutanten erreichen. Die Bildung der Suppressoren in der Δ *gpsB* Δ *minCD*-Deletionsmutante sowie der Wachstumsdefekt der *igpsB* Δ *minCD*-Mutante infolge der GpsB-Depletion lässt auf einen genetischen Zusammenhang zwischen *gpsB* und den *minCD*-Genen schließen. Durch eine Genomsequenzierung von LMSW85 (Δ *gpsB* Δ *minJ*) konnte bestätigt werden, dass dieser Stamm keine zusätzlichen Suppressormutationen trägt. Aufgrund dessen wurde LMSW85 noch einmal im Vergleich zum Wildtyp und den jeweiligen Einzelmutanten auf das Wachstum bei 37°C und mögliche

Unterschiede in der Zelllänge untersucht. Wie in Abbildung 25 (B) ersichtlich, bewirkte die Deletion von *minJ* im Δ *gpsB*-Hintergrund eine Suppression des leichten Wachstumsdefekts der Δ *gpsB*-Mutante bei 37°C und zeigte somit ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die Δ *minJ*-Einzelmutante. Neben dem Einfluss auf das Wachstum konnten auch morphologische Unterschiede zwischen der Δ *gpsB* Δ *minJ*-Doppelmutante und den jeweiligen Einzelmutanten festgestellt werden. Während sowohl der Wildtyp als auch die Δ *gpsB*- und Δ *minJ*-Mutante eine mittlere Zelllänge von 1,7 μ m aufwiesen, konnte für die Δ *gpsB* Δ *minJ*-Doppelmutante hingegen eine mittlere Zelllänge von 3 μ m bestimmt werden (Abbildung 25, C). Demzufolge entstehen durch die gemeinsame Deletion von *gpsB* und *minJ* ebenfalls additive Effekte, welches darauf hindeutet, dass auch ein funktionaler Zusammenhang zwischen GpsB und MinJ besteht.

Um die genetischen Interaktionen auch in diesem Fall auf Proteinebene untersuchen zu können, wurde ein weiteres Bacterial-Two-Hybrid-Experiment durchgeführt. Dabei zeigten sich starke Selbstwechselwirkungen von GpsB (Rismondo *et al.*, 2016) sowie Interaktionen der weiteren Komponenten mit sich selbst. Darüber hinaus gab es Wechselwirkungen von MinC und MinD und MinD und MinJ (Kaval *et al.*, 2014). GpsB interagiert mit allen Komponenten des Min-Systems (Abbildung 25, D), sodass der vermutete funktionale Zusammenhang von GpsB, MinCDJ und Lmo1549 bestätigt werden konnte.

Die isolierten Suppressorstämme der Δ *gpsB* Δ *minCD*-Mutante bei 37°C wurden Genomsequenziert und es konnten Punktmutationen in *lmo1084* (LMSW151), *murF* (LMSW152) und *fruB* (LMSW154) identifiziert werden sowie eine Leserastermutation (LMSW152) und das Auftreten eines vorzeitigen Stoppcodons in der C-terminalen Region von *clpC* (LMSW153). Für diese identifizierten Suppressorgene müsste in nachfolgenden Untersuchungen festgestellt werden, ob es sich wie bei den Mutationen in *clpC* lediglich um eine Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps handelt oder ob diese spezifisch für den Δ *gpsB* Δ *minCD*-Hintergrund sind.

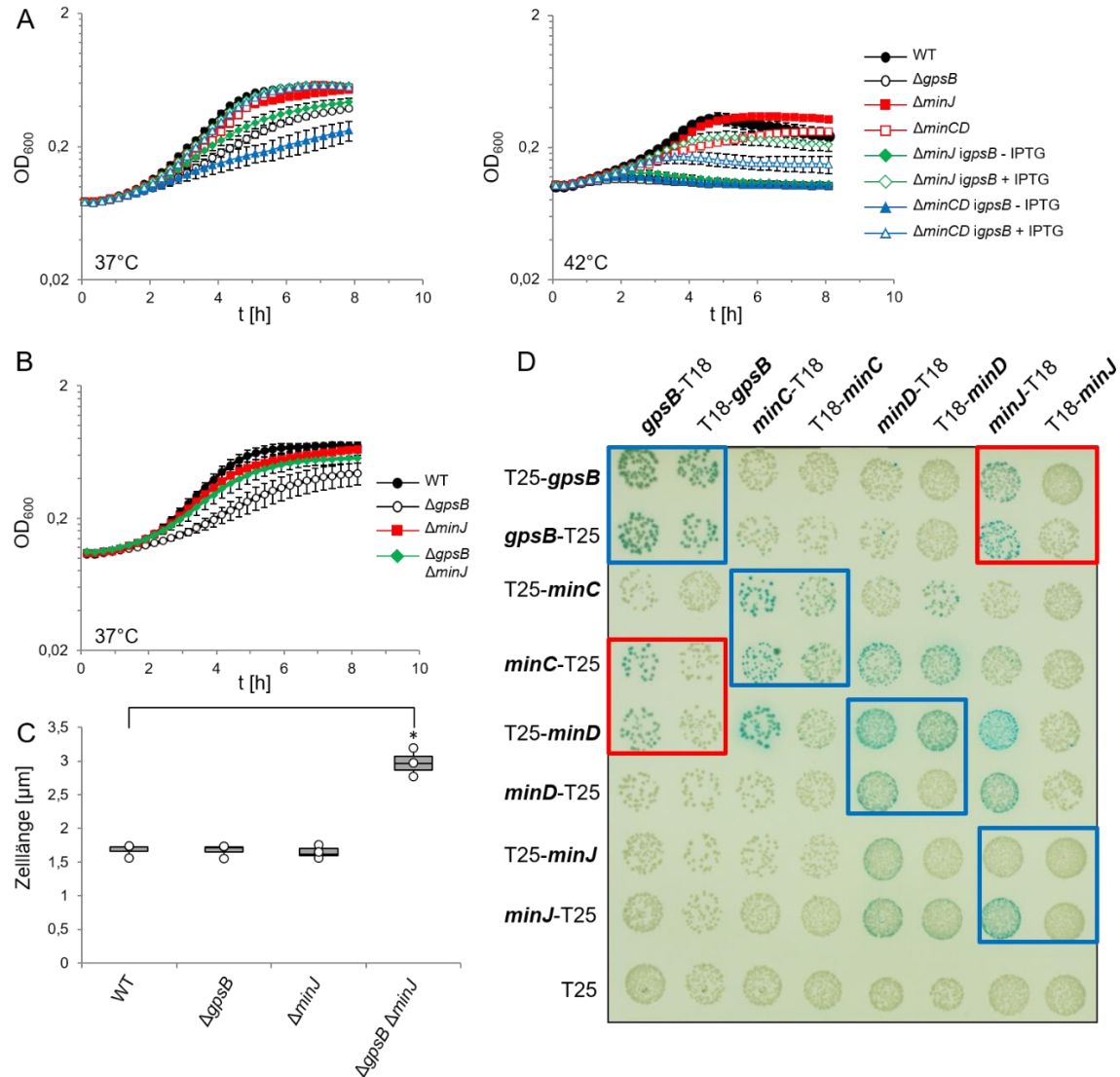


Abbildung 25: Interaktion von GpsB mit den Komponenten des Min-Systems. (A) Wachstumsverhalten der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMS120 ($\Delta minJ$), LMKK35 ($\Delta minCD$), LMSW132 (*igpsB* $\Delta minJ$) und LMSW133 (*igpsB* $\Delta minCD$) in BHI-Medium (\pm IPTG) bei 37°C und 42°C. Die Wachstumsversuche wurden dreimal wiederholt und die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt. (B) Wachstumsverhalten der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMS120 ($\Delta minJ$) und LMSW85 ($\Delta gpsB$ $\Delta minJ$) bei 37°C. Dargestellt wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Replikaten. (C) Zelllängenmessung für die *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMS120 ($\Delta minJ$) und LMSW85 ($\Delta gpsB$ $\Delta minJ$). Für jeden Stamm wurden pro Experiment 300 Zellen vermessen und die Mediane aus drei unabhängigen Messungen dargestellt. Die Werte, die sich signifikant vom Wildtyp unterscheiden, sind durch einen Stern gekennzeichnet. (D) Bacterial-Two-Hybrid-Experiment zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen zwischen GpsB und MinC, MinD und MinJ. Die entsprechenden Gene wurden mit dem T18- und T25-Fragment der Adenylatcyclase aus *Bordetella pertussis* fusioniert und die Plasmide anschließend in *E. coli* BTH101 co-transformiert. Durch das Austropfen auf selektiven Agarplatten konnten durch eine Blaufärbung der Kolonien Interaktionspartner identifiziert werden.

3.3.7 Untersuchung des Effekts der Deletionen von *lmo1549* und *gpsB* auf FtsZ

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass sowohl Lmo1549 als auch GpsB mit den Proteinen des Min-Systems interagieren. Das Min-System hat eine Funktion in der Positionierung des Z-Rings und verhindert die Z-Ringbildung in der Nähe der neu entstandenen Zellpole (Marston und Errington, 1999; Bramkamp *et al.*, 2008). Da das Min-System als Interaktionspartner von Lmo1549 und GpsB direkte Auswirkungen auf die Ausbildung des Z-Rings hat, wurde untersucht, ob auch die Deletionen von *lmo1549* und *gpsB* einen Effekt auf FtsZ besitzen. Dazu wurden die $\Delta gpsB$ -, $\Delta lmo1549$ - und $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutanten auf ihre Sensitivität gegenüber der FtsZ-Polymer-stabilisierenden Verbindung PC190723 getestet, welche die GTPase-Aktivität von FtsZ herabsetzt und somit die FtsZ-Dynamik inhibiert, welches zu einer verstärkten Ausbildung von FtsZ-Bündeln führt (Andreu *et al.*, 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass die $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante eine erhöhte Resistenz gegenüber dem FtsZ-Inhibitor besaß, während sich die $\Delta lmo1549$ -Einzelmutante wie der Wildtyp verhielt (Abbildung 26, A). Für die $\Delta gpsB$ -Einzelmutante konnte eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber PC190723 beobachtet werden, welche sich jedoch nicht signifikant vom Wildtyp unterschied. Durch die Einbringung des IPTG-induzierbaren *lmo1549*-Allels in die $\Delta gpsB$ -Mutante konnte die Zunahme der Resistenz durch die Zugabe von IPTG komplementiert werden.

In einem weiteren Experiment sollte mit Hilfe von msfGFP-ZapA-Fusionen untersucht werden, ob sich in den verschiedenen Mutanten ein Unterschied in der Ausbildung oder der Positionierung des Z-Rings oder in der Anzahl der Z-Ringe feststellen lässt, da ZapA ebenfalls wie FtsZ am Teilungsseptum lokalisiert und die FtsZ-Assemblierung begünstigt (Gueiros-Filho und Losick, 2002). Dafür wurde ein konstitutiv exprimiertes *msfgfp-zapA*-Allel in den Wildtyp und die $\Delta gpsB$ -, $\Delta lmo1549$ - und $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante eingebracht. Die erhaltenen Stämme LMLR6 (*msfgfp-zapA*), LMSW56 (*msfgfp-zapA \Delta gpsB*), LMSW55 (*msfgfp-zapA \Delta lmo1549*) und LMSW54 (*msfgfp-zapA \Delta gpsB \Delta lmo1549*) wurden nach einer Membranfärbung mit Nilrot und der Färbung der DNA mit Hoechst 33342 im TRITC-, FITC- und DAPI-Kanal mikroskopiert und die einzelnen Bilder im Anschluss überlagert (Abbildung 26, B). Der Wildtyp und die $\Delta lmo1549$ -Einzelmutante wiesen regelmäßige Stäbchen-förmige Zellen auf, bei denen msfGFP-ZapA in der Zellmitte lokalisierte und eine Ring-ähnliche Struktur ausbildete. In der $\Delta gpsB$ -Mutante war trotz der häufig gekrümmten Zellen die Lokalisation von msfGFP-ZapA in der Zellmitte erkennbar. Zudem war bei einigen Zellen eine verstärkte Blaufärbung der Zellen sichtbar, sodass in diesen Zellen wahrscheinlich die DNA verstärkt angefärbt werden konnte, da die Zellwand möglicherweise an einigen Stellen aufgrund der lytischen Eigenschaften der $\Delta gpsB$ -

Mutante bereits nicht mehr intakt war. Bei der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante war bei den Zellen mit einer zum Wildtyp vergleichbaren Zelllänge die Lokalisation von msfGFP-ZapA ebenfalls in der Mitte der Zellen zu erkennen. Bei den deutlich längeren Zellen der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante konnte eine unterschiedliche Anzahl an Lokalisationszentren des msfGFP-ZapA-Fusionsproteins in unregelmäßigen Abständen beobachtet werden, welches darauf schließen lässt, dass mehrere Zellteilungsringe in einer Zelle vorhanden sind. In einigen Zellen der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante waren zudem zwei Zellteilungsringe sehr dicht nebeneinander erkennbar (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung konnte jedoch auch vereinzelt für die drei weiteren Stämme gemacht werden, sodass dieser Effekt nicht spezifisch für die $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante zu sein scheint. Weiterhin war auch keine spiralförmige Ausbildung des Z-Rings zu beobachten, wie sie beispielsweise für die Deletion von *gpsB* in *S. pneumoniae* beschrieben wurde (Fleurie *et al.*, 2014), sodass insgesamt innerhalb dieses Versuchsaufbaus keine Unterschiede in der Struktur des Z-Rings zwischen den verschiedenen Stämmen aufgezeigt werden konnten. Des Weiteren war durch die DNA-Färbung mit Hoechst 33342 erkennbar, dass trotz der fehlenden Teilungssepten in der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante die DNA segmentiert vorlag, sodass die Chromosomensegregation unabhängig vom Einzug des Teilungsseptums erfolgt sein muss.

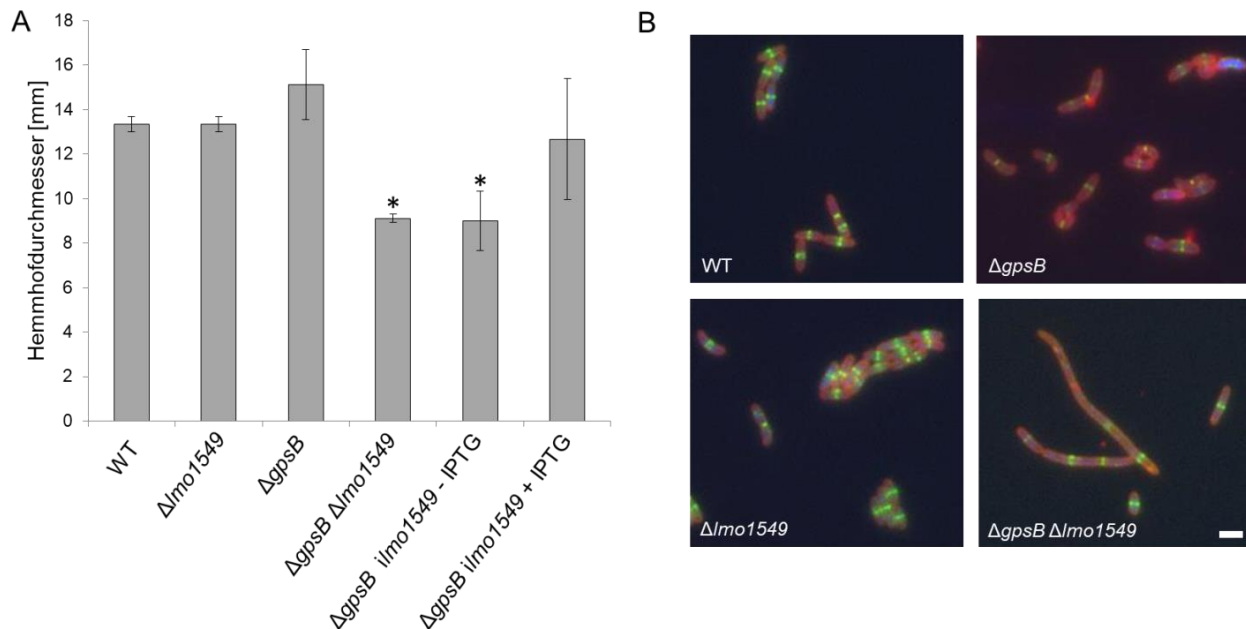


Abbildung 26: Einfluss der Deletionen von *lmo1549* und *gpsB* auf FtsZ. (A) Agardiffusionstest zur Untersuchung der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta lmo1549$), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR119 ($\Delta gpsB \Delta lmo1549$) und LMSW66 ($\Delta gpsB \Delta lmo1549$) auf ihre Sensitivität gegenüber dem FtsZ-Inhibitor PC190723. Die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Replikaten bestimmt. Die Werte, die sich signifikant vom Wildtyp unterscheiden, sind durch einen Stern markiert ($P < 0,05$, *t*-Test). (B) Fluoreszenzmikroskopie

der msfGFP-ZapA-Fusionsstämme LMLR6 (*msfgfp-zapA*), LMSW56 (*msfgfp-zapA ΔgpsB*), LMSW55 (*msfgfp-zapA Δlmo1549*) und LMSW54 (*msfgfp-zapA ΔgpsB Δlmo1549*). Die Anfärbung der Zellmembran erfolgte mit Nilrot (100 µg/ml) und die DNA-Färbung mit Hoechst 33342 (1 µg/ml). Die einzelnen Bilder wurden im TRITC- (Nilrot), FITC- (msfGFP) und DAPI- (Hoechst 33342) Kanal aufgenommen und anschließend mit Hilfe der Nikon NIS Elements Software überlagert.

4. Diskussion

4.1 Die Rolle von ReoM und ReoY in der ClpCP-vermittelten Regulation der Zellwandhomöostase

Mutationen in den Genen *reoM* und *reoY* wurden im Vorfeld dieser Arbeit als Suppressoren des Hitze-sensitiven Phänotyps der Δ *gpsB*-Mutante in *L. monocytogenes* identifiziert. In Übereinstimmung mit diesem Befund ermöglichte die Deletion von *reoM* und *reoY* im Δ *gpsB*-Hintergrund ein Wachstum bei 42°C, wohingegen die Δ *gpsB*-Einzelmutante unter diesen Bedingungen nicht vermehrungsfähig ist. Es wurde vormals ebenfalls gezeigt, dass dieser Wachstumsdefekt allein durch die artifizielle Überproduktion der UDP-GlcNAc 1-carboxyvinyltransferase MurA, welche den ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese katalysiert, supprimiert werden kann (Rismondo *et al.*, 2017). Dieser Effekt lässt sich durch die Annahme erklären, dass durch die erhöhte MurA-Menge die Peptidoglykanbiosynthese stimuliert und somit der ineffiziente Einbau von Vorstufenmolekülen in der Abwesenheit von GpsB kompensiert wird (Rismondo *et al.*, 2016; Rismondo *et al.*, 2017).

In den Zellextrakten der Δ *reoM*- und Δ *reoY*-Mutanten konnte ebenfalls eine erhöhte MurA-Menge im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden, sodass scheinbar auch in diesen Mutanten die Suppression des Hitze-sensitiven Δ *gpsB*-Phänotyps über die Akkumulation von MurA erfolgt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun, dass ReoM und ReoY an der Regulation der ClpCP-Protease beteiligt sind und darüber die Kontrolle der MurA-Stabilität beeinflussen, da MurA ein Substrat der ClpCP-Protease ist (Kock *et al.*, 2004; Rismondo *et al.*, 2017). Auch die zweite UDP-GlcNAc 1-carboxyvinyltransferase in *L. monocytogenes*, MurZ, hat einen Einfluss auf die ClpCP-abhängige MurA-Akkumulation. Durch die Identifizierung von ReoM als Substrat der PASTA-eSTPK PrkA und der zugehörigen Phosphatase PrpC, konnte über ReoM und ReoY eine Verbindung zwischen der PrkA-vermittelten Erkennung von Zellwandschäden oder Ungleichgewichten in der Zellwandhomöostase bis hin zur Stimulation der Peptidoglykanbiosynthese als Signalantwort hergestellt werden.

Die Aktivierung der Kinase-Aktivität von PrkA-Homologen durch Muropeptide (Shah *et al.*, 2008; Mir *et al.*, 2011) und dem Peptidoglykanvorstufenmolekül Lipid II (Hardt *et al.*, 2017) konnte bereits in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden. Auch die Akkumulation dieser beiden Moleküle konnte bei verstärkter Peptidoglykanhydrolyse (Vollmer *et al.*, 2008a; Irazoki *et al.*, 2019) und der Inhibierung der Peptidoglykanpolymerisierung durch Moenomycin (Kohlrausch und Holtje, 1991) beobachtet werden. Demzufolge sind sowohl die Akkumulation von Muropeptiden als auch die Akkumulation von Lipid II-Molekülen geeignete Detektionssignale,

um Zellwandschäden anzuzeigen und PrkA-Homologe zu aktivieren. Darüber hinaus konnte von Huang *et al.* gezeigt werden, dass durch die Behandlung von *S. pneumoniae* mit subletalen Konzentrationen der β -Lactam Antibiotika Penicillin und Ceftriaxon die Bildung des Kinase-/Phosphatase-Paars erhöht ist und in diesen Zellen ein erhöhtes Phosphorylierungslevel vorliegt (Huang *et al.*, 2018).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten führen zu einem Modell (Abbildung 27), in welchem die Stimulierung der integralen Membranproteinkinase PrkA in *L. monocytogenes* zur Phosphorylierung von ReoM führt. Das phosphorylierte ReoM (P-ReoM) kann die ClpCP-Protease nicht mehr aktivieren, wodurch MurA akkumuliert und die Peptidoglykanbiosynthese verstärkt erfolgt. Der gegenteilige Effekt liegt in der *reoM T7A*-Mutante vor. In diesem Stamm kann ReoM nicht mehr phosphoryliert werden, wodurch die ClpCP-Protease dauerhaft aktiv ist und MurA stetig degradiert wird, sodass kein Wachstum mehr möglich ist, da MurA für das Wachstum essenziell ist (Rismondo *et al.*, 2017).

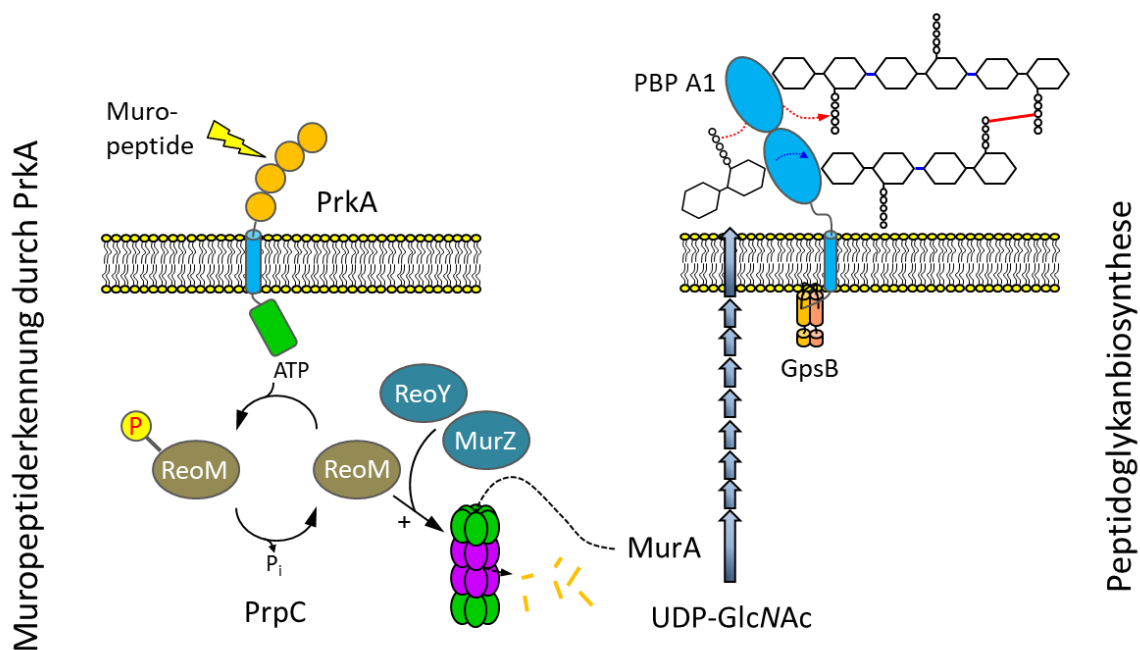


Abbildung 27: Die Signaltransduktionskaskade von der Erkennung von freien Muropeptiden zur Stimulation der Peptidoglykanbiosynthese. Über die PASTA-Domänen der eSTPK PrkA erfolgt die Bindung von freien Muropeptiden, welches zur Aktivierung der Kinase und damit zur Phosphorylierung von ReoM führt. Das unphosphorylierte ReoM aktiviert die ClpCP-abhängige Degradation von MurA, welches den ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese katalysiert. ReoY und MurZ besitzen ebenfalls eine regulatorische Funktion innerhalb dieses Prozesses. In der phosphorylierten Form erfolgt keine Aktivierung des ClpCP-abhängigen MurA-Abbaus, sodass MurA akkumuliert und die Peptidoglykanbiosynthese erfolgen kann.

Das in Abbildung 27 gezeigte Modell ist konsistent mit den gefundenen *gpsB*-Suppressormutationen in dem Phosphatase-Gen *prpC*, da auf diese Weise ein direkter genetischer Zusammenhang zwischen der Regulation des letzten Schritts der Zellwandbiosynthese durch GpsB zum ersten Schritt der hier postulierten Signaltransduktionskaskade besteht. Die Inaktivierung von *prpC* führt zu einer dauerhaften Phosphorylierung von ReoM, wodurch der ClpCP-abhängige Abbau von MurA nicht mehr erfolgt, welches wiederum in der beobachteten Akkumulation von MurA in dem PrpC-Depletionsstamm resultiert. Demzufolge führt die Deletion von *prpC* ebenso wie die Deletion von *reoM* und *reoY* im Δ *gpsB*-Hintergrund über eine Erhöhung der MurA-Menge zur Suppression des Hitze-sensitiven Phänotyps der Δ *gpsB*-Mutante.

Innerhalb eines Suppressorscreens in den *S. pneumoniae*-Stämmen D39 und Rx1 wurde *phpP* als *gpsB*-Suppressorgen identifiziert (Rued *et al.*, 2017; Lewis, 2017). Das Genprodukt von *phpP* ist ebenfalls eine Phosphatase, welche mit der korrespondierenden PASTA-eSTPK, StkP, in *S. pneumoniae* zusammenagiert und homolog zu PrpC ist. Die Inaktivierung oder Depletion von *gpsB* führt zu einer Abnahme von StkP-abhängigen Phosphorylierungen der Proteinsubstrate in den D39-Stämmen. Durch die zusätzliche Inaktivierung von *phpP* kann wieder ein Wildtyp-ähnliches Level an Proteinphosphorylierungen hergestellt werden, da die Deletion von *phpP* zu einer Hyperphosphorylierung von StkP-Substraten führt (Rued *et al.*, 2017; Ulrych *et al.*, 2016).

Aufgrund der konservierten Funktion von GpsB in *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes* und anderen *Firmicutes* liegt die Vermutung nahe, dass auch in *S. pneumoniae* der Δ *gpsB*-Phänotyp durch die Akkumulation von MurA stabilisiert werden kann, welches analog zu den Beobachtungen in *L. monocytogenes* durch die Inaktivierung von *phpP* bzw. *prpC* gegeben wäre. Diese Vermutung wird durch einen weiteren identifizierten *gpsB*-Suppressorstamm in *S. pneumoniae* unterstützt, welcher eine Duplikation eines ~150 kb großen genomischen Fragments trägt, das auch den offenen Leserahmen für MurA enthält (Rued *et al.*, 2017). Dadurch könnte es in diesem Suppressorstamm aufgrund einer Genduplikation zu einer Erhöhung der MurA-Menge kommen, welche wiederum den Δ *gpsB*-Phänotyp supprimieren würde.

In *E. faecalis* äußert sich die Inaktivierung der PASTA-eSTPK IreK durch eine verminderte Fähigkeit von *E. faecalis* den Gastrointestinaltrakt zu besiedeln (Banla *et al.*, 2018). Suppressoren dieses Phänotyps wurden isoliert und es konnten zusätzliche Mutationen in den offenen Leserahmen OG1RF_11271 und OG1RF_11272 identifiziert werden. Für die *E. faecalis* OG1RF_11271- und OG1RF_11272-Deletionsstämme konnte auch die Suppression weiterer

$\Delta ireK$ -Phänotypen, wie eine erhöhte Cholat- und Lysozymresistenz, gezeigt werden (Banla *et al.*, 2018). Das OG1RF_11272-Gen in *E. faecalis* ist homolog zu *reoY* in *L. monocytogenes*, dessen Inaktivierung die Essenzialität von *prkA* aufhebt. Somit führt sowohl die Inaktivierung von *reoY* als auch die Deletion von OG1RF_11272 zur Suppression der Phänotypen von *prkA*- und *ireK*-Mutanten in *L. monocytogenes* und *E. faecalis*. Diese Beobachtung lässt auf eine konservierte Funktion von ReoY/OG1RF_11272 in den beiden Organismen schließen, denn offensichtlich werden in verschiedenen Organismen ausgehend von der Deletion der Kinase (*prkA/ireK*) die gleichen Suppressorgene innerhalb des hier postulierten Signalwegs gefunden. Das weitere $\Delta ireK$ -Suppressorgen OG1RF_11271 ist homolog zu *lmo1922* in *L. monocytogenes*, welches mit *reoY* (*lmo1921*) ein dicistronisches Operon bildet (Toledo-Arana *et al.*, 2009). Für das Genprodukt Lmo1922 ist, wie in *E. faecalis* für OG1RF_11271, noch keine Funktion bekannt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu überprüfen, ob die Deletion von *lmo1922* ebenfalls zu einer Suppression des $\Delta prkA$ -Phänotyps führt, und somit möglicherweise noch ein weiterer Faktor des Regulationsmechanismus identifiziert werden kann. Für das Lmo1922-Homolog aus *B. subtilis* YpiA konnte eine im Vergleich zum Wildtyp 2,5-fach erhöhte MurAA-Menge in den Zellextrakten der *ypiA*-Mutante nachgewiesen werden (Janina Döhling, Masterarbeit, 2019). Demzufolge beeinflusst die Deletion von *ypiA* ebenso wie die *ypiB*- (*reoY*) und *yrzL*- (*reoM*) Deletionen die Akkumulation von MurAA, sodass auch die Deletion von *lmo1922* in *L. monocytogenes* den $\Delta prkA$ -Phänotyp durch eine erhöhte MurA-Menge in den Zellen supprimieren könnte. Jedoch kann die im Vergleich zu der 12-fach erhöhten MurAA-Menge in der *ypiB*-Mutante deutlich geringere MurAA-Akkumulation in dem *ypiA*-Stamm auch durch die gemeinsame Codierung dieser beiden Gene in einem Operon begründet sein, sodass durch die Deletion von *ypiA* auch die Expression von *ypiB* beeinflusst wird, welche zu der geringeren Akkumulation von MurAA führen könnte.

Die Rolle von MurZ in der Signaltransduktionskaskade ist bis zum jetzigen Zeitpunkt am wenigsten verstanden. Durch die durchgeführten Epistasisexperimente konnte gezeigt werden, dass MurZ ebenfalls an der ClpCP-abhängigen Akkumulation von MurA beteiligt ist, da keine additiven Effekte der MurA-Mengen in einer $\Delta clpC \Delta murZ$ -Doppelmutante im Vergleich zu den Einzelmutanten beobachtet werden konnten. Jedoch war das Wachstum der $\Delta murZ$ -Mutante bei Salzstress im Vergleich zu der $\Delta clpC$ - und $\Delta reoM$ -Mutante nur leicht beeinträchtigt, sodass die Deletion von *murZ* keinen klassischen $\Delta clpC$ -Phänotyp hervorruft und möglicherweise spezifisch bei der ClpCP-abhängigen Degradation von MurA eine Rolle spielt. Da die Deletion von *murZ* den letalen Effekt der *reoM* T7A-Punktmutation supprimiert, ist MurZ downstream von ReoM in

dem Signalweg einzuordnen. MurZ ist wie MurA eine UPD-GlcNAc-1-carboxyvinyltransferase (Marquardt *et al.*, 1994), welche eine Homologie von 47% zueinander besitzen. Jedoch konnte bereits von Rismondo *et al.* 2017 gezeigt werden, dass MurA essenziell ist, sodass MurZ die Funktion von MurA nicht vollständig übernehmen kann, obwohl sie die gleiche Reaktion katalysieren (Rismondo *et al.*, 2017). Ebenso war die Überexpression von *murZ* im Δ *gpsB*-Hintergrund nicht ausreichend, um den Hitze-sensitiven Phänotyp zu supprimieren, wie es für *murA* gezeigt werden konnte (Rismondo *et al.*, 2017). Die Akkumulation von MurA in der Abwesenheit von MurZ legt einen regulatorischen Mechanismus nahe, durch den MurA unter diesen Bedingungen stabilisiert wird. Diese Regulation müsste jedoch auf posttranslationaler Ebene erfolgen, da in einer Δ *murZ*-Mutante keine erhöhten *murA*-Transkriptmengen detektiert werden konnten (Rismondo *et al.*, 2017). Zudem wäre es möglich, dass das mRNA-Transkript nur unter bestimmten Bedingungen stabil ist. Weiterhin könnte auch eine geringere Aktivität von MurZ im Vergleich zu MurA der Grund sein, warum MurZ das Fehlen von MurA nicht kompensieren kann (Rismondo *et al.*, 2017). Diese Beobachtung ist jedoch nicht spezifisch für *L. monocytogenes*, auch in *B. subtilis* ist eine Inaktivierung von *murAB* möglich, während *murAA* essenziell ist (Kock *et al.*, 2004). In anderen *Firmicutes* wie *S. pneumoniae*, *S. aureus* und *E. faecalis* ist hingegen die einzelne Inaktivierung beider *murA*-Gene möglich (Du *et al.*, 2000; Blake *et al.*, 2009; Vesic und Kristich, 2012). Weitere Untersuchungen sind nötig um die Rolle von MurZ bei der Kontrolle der ClpCP-abhängigen MurA-Degradation aufzuklären.

4.1.1 ReoM und ReoY als potenzielle ClpC-Adaptoren

In Kapitel 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass ReoM und ReoY eine Rolle in der Regulation der ClpCP-abhängigen Degradation von MurA spielen. Der genaue Wirkungsmechanismus von ReoM und ReoY auf ClpC ist jedoch nicht bekannt, wobei eine mögliche Funktion von ReoM und ReoY als ClpC-Adaptoren denkbar wäre. In *B. subtilis* und *E. coli* sind eine Reihe von Adaptoren für die Hsp100/AAA+-Proteine beschrieben, zu denen auch ClpC gehört (Kirstein *et al.*, 2009b). Adapterproteine wie die Proteinkinase McsB werden nach erfolgter Aktivierung durch einen weiteren Faktor autophosphoryliert und beeinflussen anschließend die Stabilität ihrer Substrate, wie den Repressor CtsR, indem sie sie zur ClpCP-abhängigen Degradation überführen (Kirstein *et al.*, 2007). Ähnlich wie bei ReoM liegt diesem Prozess eine Phosphorylierung zugrunde. Jedoch bewirkt die Phosphorylierung von ReoM eine Inhibierung des Substratabbaus, während die Phosphorylierung von McsB zur Degradation von CtsR führt. Die Adaptoren MecA und YpbH wurden in *B. subtilis* durch die Überprüfung auf MurAA-

Akkumulation in den Proteinextrakten der entsprechenden Deletionsmutanten als potenzielle ClpC-Adaptoren getestet. Aufgrund der nicht vorhandenen Erhöhung der MurAA-Menge im Vergleich zum Wildtyp konnten diese jedoch als Adaptoren ausgeschlossen werden, sodass für MurA(A) bislang keine Adaptermoleküle bekannt sind (Kock *et al.*, 2004; Kirstein *et al.*, 2009b). Aufgrund des gleichen Grads der MurA-Akkumulation in den *reoM*-, *reoY*- und *clpC*-Mutanten in *L. monocytogenes* sowie der Akkumulation von GlmS, IlvB und MurAA, die sich in *reoM*-, *reoY*- und *clpC*-Deletionsstämmen von *B. subtilis* nicht signifikant voneinander unterscheidet, könnten ReoM und ReoY gleichermaßen als Adaptoren fungieren. Es könnten auch beide Proteine gemeinsam als Adapterkomplex an der ClpCP-abhängigen Degradation von MurA beteiligt sein. Alternativ müsste eines der Proteine die Funktion des Adaptors übernehmen, während das jeweils andere Protein eine untergeordnete, womöglich regulierende Funktion einnimmt. Für eine unterschiedliche Funktion der beiden Proteine spricht der Unterschied in der Empfindlichkeit gegenüber Salzstress. Die $\Delta reoM$ -Mutante zeigte dabei eine mit der $\Delta clpC$ -Mutante vergleichbare Sensitivität, wohingegen die $\Delta reoY$ - und die $\Delta murZ$ -Deletionsstämme nur eine leichte Beeinträchtigung des Wachstums aufwiesen. Auch der letale Effekt der *reoM*-Überexpression im $\Delta gpsB$ -Hintergrund, welcher für ReoY nicht beobachtet werden konnte, legt verschiedene Funktionen von ReoM und ReoY nahe (Wamp *et al.*, 2020). Außerdem ist die phylogenetische Verbreitung von ReoY auf die *Bacilli* beschränkt, während ReoM in allen *Firmicutes* vorhanden ist. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass ReoM eine allgemeinere Funktion in der ClpCP-abhängigen Degradation einnimmt, da der Phänotyp eher dem einer reinen $\Delta clpC$ -Mutante entspricht. ReoY würde demzufolge eine untergeordnete Funktion besitzen, oder für eine Feinabstimmung benötigt werden und somit an einem Zwischenschritt beteiligt sein, welcher außerhalb der *Bacilli* nicht erfolgt oder von einem anderen, nicht homologen Protein, durchgeführt wird. Die fehlende Interaktion von ReoM und ClpC im Bacterial-Two-Hybrid-Experiment (Abbildung 19) spricht jedoch gegen eine Adapterfunktion, auch wenn die Interaktion von ReoM mit dem Substrat MurA gegeben ist. ReoY interagiert hingegen mit ClpC aber nicht mit dem Substrat MurA, sodass auch hier die Funktion in der Substraterkennung fragwürdig ist. Für eine gemeinsame Funktion anhand der Bacterial-Two-Hybrid-Experimente spricht die in diesem experimentellen Aufbau deutliche Interaktionskaskade von ClpCP über ReoY und ReoM zu MurA, sodass ReoM und ReoY gemeinsam den Kontakt zwischen der ClpCP-Protease und dem Substrat MurA vermitteln.

Es wurde bereits versucht, die hypothetische Funktion von ReoM und ReoY als potenzielle Adaptoren mit Hilfe von Pulldown-Experimenten zu testen, wobei jedoch keine funktionsfähigen ReoM-His und ReoY-His Konstrukte hergestellt werden konnten. Für MurA liegt eine

funktionsfähige His-Tag-Fusion vor, mit der eine Co-Aufreinigung von ClpC auch in den $\Delta reoM$ - und $\Delta reoY$ -Mutanten gezeigt werden konnte. Jedoch wurde auch eine ClpC-Bande mit der Wildtyp-Kontrolle erhalten (Janina Döhling, Masterarbeit, 2019). Da MurA in den $\Delta reoM$ - und $\Delta reoY$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich akkumuliert und damit keine Vergleichbarkeit zum Wildtyp-Hintergrund möglich ist, kann aus diesen Beobachtungen derzeit noch keine gültige Schlussfolgerung gezogen werden. Deshalb könnte das beschriebene Pulldown-Experiment mit einer zusätzlich durch Punktmutationen in den ATP-Bindestellen (Walker-Motiven) inaktivierten ClpC ATPase-Untereinheit wiederholt werden. Sollte sich dann in einer der Aufreinigungen von MurA-His ClpC nicht mehr nachweisen lassen, sobald *reoM* oder *reoY* in diesem Hintergrund deletiert worden sind, würde dieses auf eine Funktion von ReoM oder ReoY als Adaptor in der Substraterkennung hindeuten. Ein weiterer Ansatz wäre ein *in vitro*-Degradations-Assay mit den gereinigten Proteinen, bei denen der MurA-Abbau in Abwesenheit von ReoM und ReoY nicht mehr erfolgen sollte, wenn diese eine Adapterfunktion in diesem Prozess einnehmen.

4.1.2 ReoM und ReoY als mögliche Faktoren in der Arginin-Phosphorylierung

In Eukaryoten werden Proteine, die degradiert werden sollen, mit einem Polyubiquitin-Tag markiert, welcher anschließend eine Erkennung durch die regulatorische Untereinheit des 26S-Proteasoms ermöglicht (Kerscher *et al.*, 2006; Finley, 2009). Trentini *et al.* konnten ein ähnliches System, welches auf der Phosphorylierung von Arginin-Aminosäureresten der Target-Proteine basiert, für das ClpCP-Proteasom in *B. subtilis* identifizieren (Trentini *et al.*, 2016). Grundlage für diese Untersuchungen war die Beobachtung, dass das Regulator- und ClpC-Adapterprotein McsB, welches selbst eine Arginin-Proteinkinase ist, viele verschiedene Proteine in *B. subtilis* *in vivo* phosphoryliert (Elsholz *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2014). Nach dem Modell von Trentini *et al.* besitzt ClpC zwei konservierte pArg-Bindestellen in der N-terminalen Domäne. Die Bindung des pArg-Proteins allein ist ausreichend für die Assemblierung des funktionsfähigen ClpCP-Degradasoms und ermöglicht den Abbau der Proteine unabhängig von den bekannten Adapterproteinen McsB und MecA. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe der Phosphatase YwIE, welche zusammen mit McsB agiert, die Proteindegradation inhibiert wird (Trentini *et al.*, 2016).

Für MurA in *L. monocytogenes* ist bis zum jetzigen Zeitpunkt kein Adapterprotein bekannt (Kock *et al.*, 2004), sodass eine potenzielle Adapterfunktion von ReoM und ReoY möglich wäre. Außerdem könnten ReoM, ReoY und auch MurZ an der Arginin-Phosphorylierung von MurA beteiligt sein und so den ClpCP-abhängigen Abbau vermitteln. In *L. monocytogenes* besitzt

MurA 17 Arginin-Aminosäurereste, von denen zehn in *S. aureus* und *E. faecalis* konserviert sind (Abbildung 28). Außerdem ist MurAA in *B. subtilis* eins von dreißig Arginin-phosphorylierten Proteinen, welche im Komplex mit der Arginin-Proteinphosphatase YwE nachgewiesen werden konnten (Elsholz *et al.*, 2012). Jedoch konnte MurA innerhalb verschiedener Phosphoproteomstudien noch nicht direkt als potenzieller Interaktionspartner einer Proteinkinase nachgewiesen werden, sodass eine Beteiligung vermittelnder Faktoren an diesem Prozess wahrscheinlich ist, sofern ein pArg-abhängiger Abbau von MurA erfolgt (Elsholz *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2014). Diese vermittelnde Funktion könnten ReoM und ReoY übernehmen. Die im Bacterial-Two-Hybrid-Experiment beobachtete Interaktion von ReoM und MurA könnte beispielsweise darauf hindeuten, dass ReoM in der unphosphorylierten Form die Interaktion mit einer Arginkinase vermittelt. In diesem Zusammenhang wäre es naheliegend die jeweiligen Arginin-Aminosäurereste in MurA durch Alanin zu substituieren und die jeweiligen Stämme auf die Akkumulation von MurA zu untersuchen. Sollte eine oder auch die Kombination dieser Punktmutationen zu einer Akkumulation von MurA führen, würde dieses darauf hindeuten, dass die Arginin-Phosphorylierung an dieser Stelle für die Substraterkennung verantwortlich ist. Zudem könnten auch die pArg-Bindestellen in der ClpC-NTD modifiziert werden und anschließend auf die Akkumulation von MurA getestet werden. Um Informationen über die direkte Interaktion von ClpC und MurA zu bekommen, wäre eine Co-Kristallisation der ClpC-NTD und MurA hilfreich, falls solche Komplexe gebildet werden sollten.

Ein weiterer Mechanismus, welcher auf einer Arginin-Phosphorylierung beruht, ist die McsB-abhängige Degradation von CtsR durch ClpCP in *B. subtilis*. Elsholz *et al.* konnten zeigen, dass ClpC selbst durch McsB an den Aminosäureresten Arg5 und Arg254 phosphoryliert wird und dieses eine Voraussetzung für die Aktivierung des Protease-Komplexes ist. Dabei ist die Arginin-Phosphorylierung spezifisch notwendig für den Abbau von CtsR durch ClpCP. Die MecA-abhängige Degradation von ComK konnte hingegen auch in den *clpC R5K* und *clpC R254K* Punktmutanten erfolgen (Elsholz *et al.*, 2012). Demzufolge wäre die Mutation der entsprechenden Aminosäurereste von ClpC in *L. monocytogenes* ein möglicher Ansatz, um zu überprüfen, ob eine Phosphorylierung von ClpC für die Aktivität und den MurA-Abbau benötigt wird. Eine Beteiligung an diesem Prozess könnte von ReoY ausgehen, da dieses im Bacterial-Two-Hybrid-Experiment sowohl mit ClpC als auch ClpP interagiert hat.

100

4.1.3 ReoM, ReoY und MurZ beeinflussen die Cephalosporin-Resistenz in *L. monocytogenes*

Durch die Deletion von *reoM*, *reoY* und *murZ* konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ceftriaxon beobachtet werden. Ceftriaxon gehört zu den Cephalosporinen der 3. Generation, welche β -Lactam Antibiotika sind und somit die Zellwandbiosynthese der Bakterien inhibieren. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die artifizielle Überexpression von MurA zu einer erhöhten Ceftriaxon-Resistenz führt, während die Depletion von MurA eine Zunahme der Ceftriaxon-Sensitivität bewirkt. Diese Beobachtung lässt auf einen direkten Zusammenhang zwischen der MurA-Menge und der Peptidoglykanbiosynthese schließen, sodass die erhöhte MurA-Menge die Peptidoglykanbiosynthese stimuliert, wodurch eine erhöhte Resistenz gegenüber Zellwand-schädigenden Antibiotika ermöglicht werden würde. Dass die MurA-Überexpression zu einer erhöhten Ceftriaxon-Resistenz führt, konnte auch für das homologe Protein MurAA aus *E. faecalis* gezeigt werden (Vesic und Kristich, 2012). Gegenläufig konnte für die *murAA*-Deletion eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ceftriaxon, Ceftazidim und Fosfomycin beobachtet werden. Die erhöhte Ceftriaxon-Resistenz, die durch die Deletion von *murZ* in *L. monocytogenes* gezeigt wurde, konnte für die Deletion von *murAB* in *E. faecalis* nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung könnte durch unterschiedliche Funktionen oder Regulationsmechanismen begründet werden, da *murAA* und *murAB* in *E. faecalis* einzeln deletiert werden können (Vesic und Kristich, 2012), während *murA* in *L. monocytogenes* essenziell ist (Rismondo *et al.*, 2017). Neben dem Einfluss von *murAA* auf die Ceftriaxon-Resistenz zeigten auch die Deletionen der Kinase Irek und der zugehörigen Phosphatase IreP in *E. faecalis* gegenläufige Effekte auf die Cephalosporin-Resistenz, wie es auch innerhalb dieser Arbeit für PrkA und PrpC beobachtet werden konnte (Kristich *et al.*, 2007; Kristich *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurde auch die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von IreB, dem Homologen von ReoM, als zentraler Regulationsmechanismus der Cephalosporin-Resistenz in *E. faecalis* beschrieben (Hall *et al.*, 2013). Aufgrund der ähnlichen Beobachtungen in *E. faecalis* und *L. monocytogenes* ist anzunehmen, dass auch in *E. faecalis* die unterschiedlichen Ceftriaxon-Resistenzen auf einer Stabilisierung/Destabilisierung von MurAA beruhen, welches wiederum durch die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von IreB reguliert wird.

Sowohl in *E. faecalis* als auch in *S. aureus* und *L. monocytogenes* konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cephalosporinen in der Abwesenheit der jeweiligen PASTA-eSTPK (IreK; PknB, PrkA) beobachtet werden (Kristich *et al.*, 2007; Beltramini *et al.*, 2009; Pensinger *et al.*, 2014). In *L. monocytogenes* konnte zudem auch eine erhöhte Empfindlichkeit der *prkA*-Mutante

gegenüber Ampicillin gezeigt werden (Pensinger *et al.*, 2014), welche in *S. aureus* und *E. faecalis* nicht beobachtet wurde (Kristich *et al.*, 2007; Beltramini *et al.*, 2009). Auf andere Antibiotika, welche ebenfalls die Zellwandbiosynthese inhibieren, wie beispielsweise Vancomycin, hatte die Deletion der jeweiligen Kinasen keinen Effekt. Für Antibiotika, welche die Proteinbiosynthese inhibieren, wie Kanamycin und Erythromycin, wurde ebenfalls keine verstärkte Sensitivität in Abwesenheit der PASTA-eSTPK in den verschiedenen Organismen beobachtet (Kristich *et al.*, 2007; Beltramini *et al.*, 2009; Pensinger *et al.*, 2014). Demzufolge scheint insbesondere die Cephalosporin-Resistenz durch die PASTA-eSTPK in den einzelnen Organismen reguliert zu werden. Dieses lässt darauf schließen, dass einerseits dieser Mechanismus konserviert ist und es sehr wahrscheinlich ist, dass er auch in *S. aureus* über die ClpCP-abhängige Stabilisierung von MurA verläuft, wie sie in Teilen in *E. faecalis* bereits gezeigt (Kristich *et al.*, 2007; Kristich *et al.*, 2011; Vesic und Kristich, 2012; Hall *et al.*, 2013) und in *L. monocytogenes* in dieser Arbeit beschrieben wurde. Der Grund, warum sich die Deletion der Kinase verstärkt nur auf die Sensitivität gegenüber Cephalosporinen auswirkt und nur geringe Effekte auf andere β -Lactam Antibiotika, wie Ampicillin und Penicillin, hat, ist ungeklärt. Eine mögliche Ursache wäre ein Zusammenhang zwischen der MurA-Akkumulation und einer verstärkten Expression von *L. monocytogenes* PBP B3 oder einer PrkA-abhängigen Aktivierung von PBP B3. *L. monocytogenes* PBP B3 gehört zu den PBPs, welche sich durch eine geringe Affinität gegenüber Penicillin auszeichnen, und damit eine Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika, insbesondere Cephalosporinen, vermitteln. Eine bis zu 16-fach reduzierte Cephalosporin-Resistenz konnte bereits in verschiedenen Untersuchungen von *pbpB3*-Mutanten gezeigt werden (Vicente *et al.*, 1990; Guinane *et al.*, 2006; Van de Velde *et al.*, 2009; Krawczyk-Balska und Markiewicz, 2016). Auch die Homologie von *L. monocytogenes* PBP B3 zu anderen Low-Affinity PBPs wie PBP 5 (44%) aus *E. faecium*, PBP 2a (MecA) (34%) aus *S. aureus* und PbpC (39%) aus *B. subtilis*, die ihrerseits ebenfalls zur Cephalosporin-Resistenz und der Resistenz gegenüber anderen β -Lactam-Antibiotika in diesen Organismen beitragen (Hartman und Tomasz, 1984; Zorzi *et al.*, 1996; Murray *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2001; Guinane *et al.*, 2006, Sassine *et al.*, 2017), deutet darauf hin, dass zwischen der hier identifizierten Signaltransduktionskaskade ein genereller Zusammenhang zur intrinsischen Resistenz dieser Organismen gegenüber Cephalosporinen besteht. Um auf eine mögliche PBP B3-Abhängigkeit der verstärkten Cephalosporin-Resistenz in den $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Deletionsmutanten zu testen, könnte überprüft werden, ob die Zunahme der Resistenz auch bei gleichzeitiger Inaktivierung von PBP B3 beobachtet werden kann. Sollten diese Stämme durch die Abwesenheit von PBP B3 eine andere Sensitivität als die $\Delta pbpB3$ -Einzelmutante aufweisen,

würde dieses auf einen PBP B3-unabhängigen Mechanismus in der Cephalosporin-Resistenz hindeuten. Auf der anderen Seite würde eine Erhöhung der Cephalosporin-Sensitivität der $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Deletionsmutante bei einer zusätzlichen Deletion von *pbpB3* bedeuten, dass die beobachtete erhöhte Resistenz der $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Einzelmutanten über PBP B3 vermittelt wird.

Da Fosfomycin MurA spezifisch durch eine Bindung im aktiven Zentrum inhibiert, sollte die MurA-Akkumulation in den $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Deletionsmutanten erwartungsgemäß zu einer erhöhten Fosfomycin-Resistenz führen. Dieses wurde für die artifizielle Überproduktion von MurA(A) in *L. monocytogenes* und *E. faecalis* beobachtet (Vesic und Kristich, 2012; Rismondo *et al.*, 2017), konnte jedoch für die oben genannten Deletionsstämme nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die nicht auftretende Zunahme der Fosfomycin-Resistenz trotz der beobachteten MurA-Akkumulation in den $\Delta clpC$ -, $\Delta reoM$ -, $\Delta reoY$ - und $\Delta murZ$ -Deletionsmutanten könnte dadurch begründet sein, dass durch die Gendeletionen zusätzliche Prozesse betroffen sind, die die erwarteten Effekte in der Fosfomycin-Resistenz maskieren.

Die neue Antibiotikaklasse der Acyldepsipeptide (ADEPs) inhibiert die generelle und regulatorische Proteolyse, indem es die Interaktion von ClpP mit den Hsp100 ATPase-Untereinheiten inhibiert, sodass sich kein funktioneller Protease-Komplex bilden kann. Gleichzeitig ermöglicht eine Reprogrammierung von ClpP die Erkennung und den Abbau von Polypeptiden, wohingegen das sonst regulierte ClpP nur kleine Peptide abbauen kann. (Kirstein *et al.*, 2009a). In dieser Arbeit wurde beschrieben, dass die Inaktivierung der ClpCP-abhängigen Degradation von MurA zu einer Stimulation der Peptidoglykanbiosynthese infolge der MurA-Akkumulation führt und dadurch die Cephalosporin-Resistenz erhöht wird. Sollten somit ADEPs und Cephalosporine innerhalb eines Therapieansatzes kombiniert werden, kann eine Kontraindikation vorliegen. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass die Akkumulation von MurA durch die Behandlung mit ADEPs nicht gezeigt wurde, und dass Organismen wie *E. faecalis* und auch *L. monocytogenes* natürlich resistent gegenüber Cephalosporinen sind und diese somit keine therapeutische Anwendung in diesen Organismen finden (Troxler *et al.*, 2000; Vesic und Kristich, 2012).

Die beschriebenen Beobachtungen für die einzelnen Mitglieder der *Firmicutes* bezüglich der Beeinflussung der Antibiotika-Resistenz durch die jeweiligen PASTA-eSTPKs, der Effekt der Phosphorylierung/Dephosphorylierung ihrer Substrate und das Auffinden von Suppressoren, welche innerhalb der postulierten Signaltransduktionskette auftreten, lässt auf einen konservierten Mechanismus schließen, welcher bereits in Teilen für die jeweiligen Organismen beschrieben wurde. Dabei bleibt der genaue Mechanismus, über welchen ReoM und ReoY die ClpCP-Aktivität kontrollieren, noch ungeklärt und muss durch weitere Experimente untersucht werden.

Ein interessanter Ansatz wäre die Überprüfung, ob sich die Signalkaskade durch die Zugabe von D-Ala-D-Ala-Muropeptiden oder Lipid II-Vorstufenmolekülen induzieren lässt und eine MurA-Akkumulation beobachtet werden kann. Darüber hinaus müssten die im Bacterial-Two-Hybrid-Experiment gezeigten *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen durch *in vitro*-Experimente mit den gereinigten Proteinen bestätigt werden. Dieses würde auch zu einem besseren Verständnis des regulatorischen Mechanismus führen und könnte auch eine Untersuchung von potenziellen (Arginin)-Phosphorylierungsprozessen an den bereits in der Literatur beschriebenen Aminosäureresten von ClpC und MurA ermöglichen.

Insgesamt bildet das beschriebene Modell eine gute Basis, um bereits bekanntes Wissen in den verschiedenen Organismen in einen logischen Zusammenhang zu stellen.

4.2 Die Funktion von Lmo1549 in der Zellteilung von *L. monocytogenes*

Das Gen *lmo1549* wurde ebenfalls durch die Sequenzierung von *gpsB*-Suppressorstämmen identifiziert. Durch die Deletion von *lmo1549* im Δ *gpsB*-Hintergrund konnte jedoch nur eine partielle Suppression des Hitze-sensitiven Δ *gpsB*-Phänotyps erreicht werden. Auch die nicht vorhandene MurA-Akkumulation in den Zellextrakten der Δ *lmo1549*-Mutante unterscheidet dieses Suppressorgen von den anderen identifizierten Genen (*clpC*, *murZ*, *reoM* und *reoY*). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Δ *gpsB* Δ *lmo1549*-Doppelmutante einen Zellteilungsphänotyp besitzt, da die Zellen dieses Stammes deutlich länger sind als die des Wildtyps. Durch einen Screen nach genetischen oder physikalischen Interaktionen mit weiteren Zellteilungsproteinen konnten in verschiedenen Experimenten (Wachstumsverhalten, Zelllängenmessung) genetische Interaktionen mit den Proteinen des Min-Systems beobachtet werden, sodass Lmo1549 eine Funktion in der Regulation der Assemblierung des Z-Rings einnehmen könnte. Eine Regulatorfunktion im Sinne der Rekrutierung der Min-Proteine zum Teilungsseptum ist bereits für DivIVA in *L. monocytogenes* beschrieben (Kaval *et al.*, 2014).

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit zusätzlich ein Zusammenhang zwischen dem DivIVA-Paralog GpsB und den Proteinen des Min-Systems gezeigt werden, da sich auch hier physikalische und genetische Interaktionen zwischen GpsB und MinCDJ nachweisen ließen.

Das *lmo1549*-Gen wurde zunächst aufgrund der Homologie zu dem DNA-Reparaturprotein aus *E. coli*, für welches ein Einfluss auf die Strahlungssensitivität beschrieben wurde (Felzenszwalb *et al.*, 1984), als *radC* annotiert. In späteren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die für den Strahlungs-sensitiven Phänotyp verantwortliche Mutation in dem Gen *recG* liegt (Lombardo und Rosenberg, 2000). Innerhalb dieser Arbeit konnte auch für *lmo1549* (*radC*) eine Funktion als DNA-Reparaturgen ausgeschlossen werden, da die Deletion von *lmo1549* keinen Einfluss auf die Strahlungssensitivität von *L. monocytogenes* hatte.

Ein Sequenzvergleich von Lmo1549 mit homologen Proteinen aus anderen Organismen zeigte, dass die chromosomale Lokalisation von *lmo1549* upstream des *mreBCD*-Genclusters, welches für die Aufrechterhaltung der Zellform in Stäbchen-förmigen Bakterien benötigt wird, konserviert ist (Levin *et al.*, 1992; Kruse *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Beobachtung sowie des Zelllängenphänotyps der $\Delta\textit{gpsB} \Delta\textit{lmo1549}$ -Doppelmutante wurde untersucht, ob ein funktioneller Zusammenhang zwischen Lmo1549 und dem MreBCD-Operon besteht. Durch die Deletion von *lmo1549* konnten jedoch keine direkten Auswirkungen auf die Zellform beobachtet werden, sodass anzunehmen ist, dass Lmo1549 keine oder nur eine untergeordnete Funktion in der Aufrechterhaltung der Stäbchenform einnimmt. Die Gene der Proteine des MinCD-Komplexes (*lmo1545-lmo1544*), welche an der Positionierung des Z-Rings während der Zellteilung beteiligt sind und dessen Assemblierung an den neuen Zellpolen verhindern (Marston und Errington, 1999; Bramkamp *et al.*, 2008), sind weiter downstream von *lmo1549* lokalisiert und konnten als Interaktionspartner von *lmo1549* identifiziert werden. Diese Interaktionen und der Zelllängenphänotyp der $\Delta\textit{gpsB} \Delta\textit{lmo1549}$ -Doppelmutante deuten auf eine Funktion von Lmo1549 in der Zellteilung hin. Für den Zellteilungsregulator DivIVA konnte in *B. subtilis* und *L. monocytogenes* gezeigt werden, dass die Lokalisation von MinC und MinD am Teilungsseptum von DivIVA abhängt. In *B. subtilis* konnte die DivIVA-abhängige Rekrutierung von MinJ ebenfalls gezeigt werden, wohingegen die MinJ-Lokalisation in *L. monocytogenes* nicht von DivIVA abhängt (Bramkamp *et al.*, 2008; Patrick und Kearns, 2008; Kaval *et al.*, 2014). Untersuchungen zur Lokalisation der Min-Proteine in Abwesenheit von Lmo1549, wie sie von Kaval *et al.* (2014) für DivIVA durchgeführt wurden, zeigten, dass die Lokalisation der Min-Proteine unabhängig von Lmo1549 erfolgt (Daten nicht gezeigt). Obwohl Lmo1549 und DivIVA mit den Proteinen des Min-Systems interagieren, unterscheidet sich der Phänotyp einer $\Delta\textit{divIVA} \Delta\textit{lmo1549}$ -Doppelmutante nicht von dem der Einzelmutanten. Somit ist die Deletion von

divIVA dominant gegenüber der *lmo1549*-Deletion oder die Effekte der Deletion betreffen unterschiedliche Bereiche, sodass in den untersuchten Phänotypen keine synergistischen Effekte auf die Zellteilung beobachtet werden konnten. Die Überexpression der Min-Proteine in der $\Delta gpsB$ -, der $\Delta lmo1549$ - und der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante hatte ebenfalls keinen bzw. keinen zusätzlichen Einfluss auf die Zellmorphologie im Vergleich zu den nicht-induzierten Stämmen (Daten nicht gezeigt), welches darauf schließen lässt, dass die beobachteten Phänotypen auf der gemeinsamen Deletion beruhen und Lmo1549 keinen regulatorischen Einfluss auf die Min-Proteine hat. Denn die Überexpression der Min-Proteine bei gleichbleibender Lmo1549-Menge hätte sehr wahrscheinlich zu einer Fehlregulation geführt, welche sich wiederum in einem veränderten Phänotyp geäußert hätte. Da keine Auswirkungen auf die Lokalisation der Min-Proteine beobachtet wurden, wurde überprüft, ob in der $\Delta lmo1549$ - und der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante Veränderungen in der Ausbildung des Zellteilungsringes auftreten, da dieses die Zielstruktur des Min-Systems ist. Jedoch gab es keine quantifizierbaren Unterschiede in der Positionierung des Z-Rings sowie der Anzahl der Zellteilungsringe zwischen der $\Delta lmo1549$ - und der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Mutante und dem Wildtyp, wie mit Hilfe der ZapA-GFP-Lokalisationsstudien gezeigt wurde. Dass Lmo1549 einen potenziellen Einfluss auf die FtsZ-Polymerisierung hat, konnte durch die erhöhte Resistenz der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante gegenüber dem FtsZ-Inhibitor PC190723 gezeigt werden. Dabei reduziert PC190723 die GTPase-Aktivität von FtsZ, wodurch verstärkt FtsZ-Bündel gebildet werden, da diese nicht mehr im Verlauf der FtsZ-Dynamik disassemblieren können (Andreu *et al.*, 2010). Eine erhöhte Resistenz gegenüber PC190723 würde darauf hindeuten, dass in der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante die Disassemblierung von FtsZ-Filamenten begünstigt ist. Dieses könnte auch zu der beobachteten größeren Zelllänge führen, wenn die Bildung des Z-Rings in der Doppelmutante verzögert ist, aber die laterale Zellwandbiosynthese unverändert bzw. unabhängig von der Verzögerung weiterverläuft. Eine weitere Möglichkeit wären strukturelle Veränderungen am Z-Ring und der Zugänglichkeit der einzelnen Proteine durch die Abwesenheit von Lmo1549 und GpsB, wodurch die Bindung von PC190723 an die FtsZ-Moleküle schlechter erfolgen kann.

Diese Schlussfolgerungen würden darauf hindeuten, dass Lmo1549 und GpsB einen Effekt auf das Min-System ausüben. Diese vermuteten Interaktionen von GpsB und dem Min-System konnten auch unabhängig von Lmo1549 gezeigt werden. Dabei resultierte die gemeinsame Inaktivierung von GpsB und MinJ in einer noch deutlicheren Verlängerung der Zellen, als sie für die $\Delta minJ \Delta lmo1549$ -Doppelmutante beobachtet werden konnte. Die generierte $\Delta gpsB \Delta minCD$ -Doppelmutante war instabil und zeigte die Bildung spontaner Suppressoren. Zusätzlich konnten

im Bacterial-Two-Hybrid-Experiment *in vivo*-Protein-Protein-Interaktionen von GpsB und allen Komponenten des Min-Systems detektiert werden. Der stärkere Phänotyp der Kombination der *gpsB*-Deletion mit denen der *min*-Gene im Vergleich zu den *lmo1549*-Doppelmutanten ließe sich einerseits durch eine bedeutendere Funktion von GpsB im Zusammenhang mit dem Mechanismus des Min-Systems erklären oder durch die zahlreichen weiteren regulatorischen Aufgaben von GpsB in der Zellwandbiosynthese und der Zellteilung (Rismondo *et al.*, 2015).

Insgesamt zeigen die Daten, dass GpsB und Lmo1549 mit den Komponenten des Min-Systems sowohl auf genetischer als auch auf physikalischer Ebene interagieren und dieses sehr wahrscheinlich wiederum Auswirkungen auf die FtsZ-Polymerisierung hat.

Für GpsB in *S. aureus* wurde bereits eine Funktion in der Ausbildung und der Organisation der FtsZ-Filamente sowie die Stimulation der FtsZ-GTPase-Aktivität beschrieben (Eswara *et al.*, 2018). Das Fehlen dieser Funktion von GpsB könnte die leicht erhöhte Suszeptibilität der Δ *gpsB*-Mutante gegenüber PC190723 erklären, da in diesem Stamm dann sowohl durch den FtsZ-Inhibitor als auch durch die Inaktivierung von GpsB die GTPase-Aktivität beeinflusst wird. Auch wenn in anderen Organismen noch keine direkten Interaktionen von GpsB mit FtsZ bekannt sind, sind jedoch in *S. pneumoniae* und *B. subtilis* Interaktionen von GpsB mit den jeweiligen PASTA-eSTPK beschrieben. Die Kinasen lokalisieren in diesen Organismen mit dem Zellteilungsapparat, wobei GpsB in *B. subtilis* die Aktivität von PrkC über einen negativen Feedback-Loop reguliert und in *S. pneumoniae* sowohl für die Kinase-Aktivität als auch die septale Lokalisation benötigt wird (Fleurie *et al.*, 2014; Pompeo *et al.*, 2015). Interessanterweise konnte für StkP in *S. pneumoniae* *in vitro* die Bindung und Polymerisierung von rekombinantem FtsZ gezeigt werden. Jedoch konnte in Abwesenheit von StkP weder eine Inhibierung der Z-Ringbildung noch eine Veränderung in der FtsZ-Phosphorylierung beobachtet werden. Aufgrund dessen wird vermutet, dass StkP erst am Teilungsseptum lokalisiert, wenn der Z-Ring bereits gebildet ist. Dennoch wird eine bis jetzt unbekannte Rolle von StkP in der Zellteilung vermutet (Giefing *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Beobachtung sowie der beschriebenen Phosphorylierung von DivIVA in *S. pneumoniae* und der Identifizierung anderer Zellwand-assoziiierter Komponenten, wie beispielweise MreB (Lima *et al.*, 2011), als potenzielle PrkA-Interaktionspartner in *L. monocytogenes*, liegt die Vermutung nahe, dass auch Lmo1549 Teil eines bislang nicht beschriebenen STPK-abhängigen Regulationsmechanismus ist. Um dieses zu überprüfen, könnte auch in *L. monocytogenes* getestet werden, ob die Lokalisation von PrkA durch die Inaktivierung von GpsB oder Lmo1549 beeinflusst wird oder sich andere Phänotypen bei gemeinsamer Deletion beobachten lassen. Sollten Lmo1549 und GpsB Effekte auf die FtsZ-Polymerisierung haben, wäre eine direkte Visualisierung des Z-Rings über FtsZ-GFP-Fusionen

anstelle der ZapA-GFP-Fusionen möglicherweise aufschlussreicher. Des Weiteren ist auch in Anbetracht der Funktion der weiteren identifizierten Suppressorgene eine mögliche Funktion von Lmo1549 im Protein-Turnover nicht ausgeschlossen, sodass auch die FtsZ-Mengen in den Zellextrakten der $\Delta lmo1549$ -Einzelmutante und der $\Delta gpsB \Delta lmo1549$ -Doppelmutante bestimmt werden könnten. Möglicherweise könnten über eine native PAGE auch Unterschiede in der Polymerisierung/Oligomerisierung von FtsZ zwischen den Mutanten und dem Wildtyp festgestellt werden. Grundsätzlich sollte auch noch einmal gezeigt werden, dass die beobachteten Interaktionen zwischen MinCDJ und GpsB nicht auf den pleiotropen Effekten der *gpsB*-Deletion beruhen. Demzufolge könnten beispielsweise die Auswirkungen der Deletion von *minC*, *minD* oder *minJ* in der $\Delta pbpA1 \Delta gpsB$ -Doppelmutante untersucht werden.

Zudem könnte ein weiterer Screen nach *gpsB*-Suppressorgenen Aufschluss über die Funktion von GpsB geben, da sowohl in dem zweiten Suppressor-Screen im $\Delta gpsB$ -Hintergrund als auch in der $\Delta minCD \Delta gpsB$ -Doppelmutante neue Gene identifiziert wurden, was darauf hindeutet, dass der Screen noch nicht gesättigt ist. Auch die Beobachtung, dass die identifizierten *gpsB*-Suppressormutationen in ClpC verstärkt im C-Terminus auftreten, während viele wichtige Motive, wie die ATP- oder die pArg-Bindestelle in der N-terminalen Domäne liegen (Wang *et al.*, 2011; Trentini *et al.*, 2016), könnte einen Untersuchungsansatz für die Regulation von ClpC durch die anderen Suppressorgene darstellen.

5. Referenzen

- Abhayawardhane, Y., and Stewart, G.C.** (1995). *Bacillus subtilis* possesses a second determinant with extensive sequence similarity to the *Escherichia coli mreB* morphogene. *J Bacteriol* **177**, 765-773.
- Adams, D.W., and Errington, J.** (2009). Bacterial cell division: Assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol* **7**, 642-653.
- Allerberger, F., and Wagner, M.** (2010). Listeriosis: A resurgent foodborne infection. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **16**, 16-23.
- Andreu, J.M., Schaffner-Barbero, C., Huecas, S., Alonso, D., Lopez-Rodriguez, M.L., Ruiz-Avila, L.B., Nunez-Ramirez, R., Llorca, O., and Martin-Galiano, A.J.** (2010). The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem* **285**, 14239-14246.
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Débarbouillé, M.** (2004). New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6887-6891.
- Azimi, P.H., Koranyi, K., and Lindsey, K.D.** (1979). *Listeria monocytogens*: Synergistic effects of ampicillin and gentamicin. *American journal of clinical pathology* **72**, 974-977.
- Baker, T.A., and Sauer, R.T.** (2006). ATP-dependent proteases of bacteria: Recognition logic and operating principles. *Trends in biochemical sciences* **31**, 647-653.
- Banla, I.L., Kommineni, S., Hayward, M., Rodrigues, M., Palmer, K.L., Salzman, N.H., and Kristich, C.J.** (2018). Modulators of *Enterococcus faecalis* cell envelope integrity and antimicrobial resistance influence stable colonization of the mammalian gastrointestinal tract. *Infect Immun* **86**.
- Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D.** (2008). Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews* **32**, 168-207.
- Barthe, P., Mukamolova, G.V., Roumestand, C., and Cohen-Gonsaud, M.** (2010). The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure (London, England : 1993)* **18**, 606-615.
- Beall, B., and Lutkenhaus, J.** (1989). Nucleotide sequence and insertional inactivation of a *Bacillus subtilis* gene that affects cell division, sporulation, and temperature sensitivity. *J Bacteriol* **171**, 6821-6834.
- Beilharz, K., Novakova, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., and Veening, J.W.** (2012). Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E905-913.
- Beltramini, A.M., Mukhopadhyay, C.D., and Pancholi, V.** (2009). Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. *Infect Immun* **77**, 1406-1416.
- Benson, T.E., Filman, D.J., Walsh, C.T., and Hogle, J.M.** (1995). An enzyme-substrate complex involved in bacterial cell wall biosynthesis. *Nature structural biology* **2**, 644-653.
- Bertsche, U., Breukink, E., Kast, T., and Vollmer, W.** (2005). *In vitro* murein peptidoglycan synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1B from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 38096-38101.
- Bi, E.F., and Lutkenhaus, J.** (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**, 161-164.
- Bisson-Filho, A.W., Hsu, Y.P., Squyres, G.R., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Sun, Y., Dekker, C., Holden, S., VanNieuwenhze, M.S., et al.** (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science* **355**, 739-743.
- Blake, K.L., O'Neill, A.J., Mengin-Lecreulx, D., Henderson, P.J., Bostock, J.M., Dunsmore, C.J., Simmons, K.J., Fishwick, C.W., Leeds, J.A., and Chopra, I.** (2009). The nature of

Staphylococcus aureus MurA and MurZ and approaches for detection of peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Mol Microbiol* **72**, 335-343.

Blanot, S., Boumaila, C., and Berche, P. (1999). Intracerebral activity of antibiotics against *Listeria monocytogenes* during experimental rhombencephalitis. *J Antimicrob Chemother* **44**, 565-568.

Blasios, V., Bisson-Filho, A.W., Castellen, P., Nogueira, M.L., Bettini, J., Portugal, R.V., Zeri, A.C., and Gueiros-Filho, F.J. (2013). Genetic and biochemical characterization of the MinC-FtsZ interaction in *Bacillus subtilis*. *PloS one* **8**, e60690.

Blumberg, P.M., and Strominger, J.L. (1974). Interaction of penicillin with the bacterial cell: Penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. *Bacteriological reviews* **38**, 291-335.

Bouhss, A., Crouvoisier, M., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2004). Purification and characterization of the bacterial MraY translocase catalyzing the first membrane step of peptidoglycan biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 29974-29980.

Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D., and Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS microbiology reviews* **32**, 208-233.

Boutte, C.C., Baer, C.E., Papavinasundaram, K., Liu, W., Chase, M.R., Meniche, X., Fortune, S.M., Sassetti, C.M., Ioerger, T.R., and Rubin, E.J. (2016). A cytoplasmic peptidoglycan amidase homologue controls mycobacterial cell wall synthesis. *eLife* **5**.

Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R.A., and Errington, J. (2008). A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol Microbiol* **70**, 1556-1569.

Briley, K., Jr., Prepiak, P., Dias, M.J., Hahn, J., and Dubnau, D. (2011). Maf acts downstream of ComGA to arrest cell division in competent cells of *B. subtilis*. *Mol Microbiol* **81**, 23-39.

Brown, E.D., Vivas, E.I., Walsh, C.T., and Kolter, R. (1995). MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 4194-4197.

Butler, S.M., Festa, R.A., Pearce, M.J., and Darwin, K.H. (2006). Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol Microbiol* **60**, 553-562.

Cabrita, P., Trigo, M.J., Ferreira, R.B., and Brito, L. (2014). Is the exoproteome important for bacterial pathogenesis? Lessons learned from interstrain exoprotein diversity in *Listeria monocytogenes* grown at different temperatures. *Omic : a journal of integrative biology* **18**, 553-569.

Camberg, J.L., Hoskins, J.R., and Wickner, S. (2009). ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 10614-10619.

Carballido-Lopez, R., and Formstone, A. (2007). Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology* **10**, 611-616.

Cassenego, A.P., de Oliveira, N.E., Laport, M.S., Abranches, J., Lemos, J.A., and Giambiagi-deMarval, M. (2016). The CtsR regulator controls the expression of *clpC*, *clpE* and *clpP* and is required for the virulence of *Enterococcus faecalis* in an invertebrate model. *Antonie van Leeuwenhoek* **109**, 1253-1259.

Chen, G.Y., Pensinger, D.A., and Sauer, J.D. (2017). *Listeria monocytogenes* cytosolic metabolism promotes replication, survival, and evasion of innate immunity. *Cell Microbiol* **19**.

Cho, H., Wivagg, C. N., Kapoor, M., Barry, Z., Rohs, P., Suh, H., Marto, J. A., Garner, E. C., & Bernhardt, T. G. (2016). Bacterial cell wall biogenesis is mediated by SEDS and PBP polymerase families functioning semi-autonomously. *Nature microbiology*, **1**, 16172.

Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L.W., Daniel, R.A., Errington, J., and Edwards, D.H. (2008). Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **68**, 1029-1046.

- Cleverley, R.M., Rismondo, J., Lockhart-Cairns, M.P., Van Bentum, P.T., Egan, A.J., Vollmer, W., Halbedel, S., Baldock, C., Breukink, E., and Lewis, R.J.** (2016). Subunit arrangement in GpsB, a regulator of cell wall biosynthesis. *Microb Drug Resist* **22**, 446-460.
- Cleverley, R.M., Rutter, Z.J., Rismondo, J., Corona, F., Tsui, H.T., Alatawi, F.A., Daniel, R.A., Halbedel, S., Massidda, O., Winkler, M.E., et al.** (2019). The cell cycle regulator GpsB functions as cytosolic adaptor for multiple cell wall enzymes. *Nat Commun* **10**, 261.
- Cohen, P.** (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature cell biology* **4**, E127-130.
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P.A., Zanardi, E., Ghidini, S., and Ianieri, A.** (2017). *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens (Basel, Switzerland)* **6**.
- Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., and Stackebrandt, E.** (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International journal of systematic bacteriology* **41**, 240-246.
- Considine, K.M., Sleator, R.D., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., and Hill, C.** (2011). Identification and characterization of an essential gene in *Listeria monocytogenes* using an inducible gene expression system. *Bioengineered bugs* **2**, 150-159.
- Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V., and Deshaies, R.J.** (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* **298**, 608-611.
- Cossart, P.** (2007). Listeriology (1926-2007): The rise of a model pathogen. *Microbes and infection* **9**, 1143-1146.
- Cossart, P.** (2011). Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19484-19491.
- Cossart, P., and Helenius, A.** (2014). Endocytosis of viruses and bacteria. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **6**.
- Cossart, P., and Lecuit, M.** (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: Bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo j* **17**, 3797-3806.
- Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S.X., Wirtz, D., and Lutkenhaus, J.** (2008). MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Current biology : CB* **18**, 235-244.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., and Errington, J.** (2000). Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **35**, 299-311.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., Katis, V.L., Wake, R.G., and Errington, J.** (1998). Characterization of the essential cell division gene *ftsL* (*yIIID*) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol Microbiol* **29**, 593-604.
- Daniel, R.A., Noirot-Gros, M.F., Noirot, P., and Errington, J.** (2006). Multiple interactions between the transmembrane division proteins of *Bacillus subtilis* and the role of FtsL instability in divisome assembly. *J Bacteriol* **188**, 7396-7404.
- Daniel, R.A., Williams, A.M., and Errington, J.** (1996). A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 2343-2350.
- de Boer, P., Crossley, R., and Rothfield, L.** (1992). The essential bacterial cell-division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**, 254-256.
- de las Heras, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K., and Vazquez-Boland, J.A.** (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current opinion in microbiology* **14**, 118-127.
- Dephoure, N., Gould, K.L., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R.** (2013). Mapping and analysis of phosphorylation sites: A quick guide for cell biologists. *Mol Biol Cell* **24**, 535-542.

- Deuerling, E., Mogk, A., Richter, C., Purucker, M., and Schumann, W. (1997). The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes such as sporulation, stress adaptation and secretion. *Mol Microbiol* **23**, 921-933.
- Disson, O., Grayo, S., Huillet, E., Nikitas, G., Langa-Vives, F., Dussurget, O., Ragon, M., Le Monnier, A., Babinet, C., Cossart, P., et al. (2008). Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* **455**, 1114-1118.
- Döhling, J. (2019). Untersuchungen zur Zellteilung in *Listeria monocytogenes*. Masterarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Doganay, M. (2003). Listeriosis: Clinical presentation. *FEMS immunology and medical microbiology* **35**, 173-175.
- Dominguez-Escobar, J., Chastanet, A., Crevenna, A.H., Fromion, V., Wedlich-Soldner, R., and Carballido-Lopez, R. (2011). Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science* **333**, 225-228.
- dos Santos, V.T., Bisson-Filho, A.W., and Gueiros-Filho, F.J. (2012). DivIVA-mediated polar localization of ComN, a posttranscriptional regulator of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **194**, 3661-3669.
- Du, W., Brown, J.R., Sylvester, D.R., Huang, J., Chalker, A.F., So, C.Y., Holmes, D.J., Payne, D.J., and Wallis, N.G. (2000). Two active forms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase in gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **182**, 4146-4152.
- Duman, R., Ishikawa, S., Celik, I., Strahl, H., Ogasawara, N., Troc, P., Lowe, J., and Hamoen, L.W. (2013). Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E4601-4610.
- Dworkin, J. (2015). Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria. *Current opinion in microbiology* **24**, 47-52.
- Dziedzic, R., Kiran, M., Plocinski, P., Ziolkiewicz, M., Brzostek, A., Moomey, M., Vadrevu, I.S., Dziadek, J., Madiraju, M., and Rajagopalan, M. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* ClpX interacts with FtsZ and interferes with FtsZ assembly. *PloS one* **5**, e11058.
- Egan, A.J., Cleverley, R.M., Peters, K., Lewis, R.J., and Vollmer, W. (2017). Regulation of bacterial cell wall growth. *The FEBS journal* **284**, 851-867.
- Egan, A.J., and Vollmer, W. (2013). The physiology of bacterial cell division. *Ann N Y Acad Sci* **1277**, 8-28.
- Ehlert, K., and Holtje, J.V. (1996). Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 6766-6771.
- Elsholz, A.K., Hempel, K., Michalik, S., Gronau, K., Becher, D., Hecker, M., and Gerth, U. (2011). Activity control of the ClpC adaptor McsB in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**, 3887-3893.
- Elsholz, A.K., Turgay, K., Michalik, S., Hessling, B., Gronau, K., Oertel, D., Mader, U., Bernhardt, J., Becher, D., Hecker, M., et al. (2012). Global impact of protein arginine phosphorylation on the physiology of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 7451-7456.
- Emami, K., Guyet, A., Kawai, Y., Devi, J., Wu, L.J., Allenby, N., Daniel, R.A., and Errington, J. (2017). RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nature microbiology* **2**, 16253.
- Erbse, A., Schmidt, R., Bornemann, T., Schneider-Mergener, J., Mogk, A., Zahn, R., Dougan, D.A., and Bukau, B. (2006). ClpS is an essential component of the N-end rule pathway in *Escherichia coli*. *Nature* **439**, 753-756.
- Errington, J., and Wu, L.J. (2017). Cell cycle machinery in *Bacillus subtilis*. *Sub-cellular biochemistry* **84**, 67-101.
- Erzberger, J.P., and Berger, J.M. (2006). Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **35**, 93-114.
- Eswara, P.J., Brzozowski, R.S., Viola, M.G., Graham, G., Spanoudis, C., Trebino, C., Jha, J., Aubee, J.I., Thompson, K.M., Camberg, J.L., et al. (2018). An essential *Staphylococcus aureus* cell division protein directly regulates FtsZ dynamics. *eLife* **7**.

- Eswaramoorthy, P., Erb, M.L., Gregory, J.A., Silverman, J., Pogliano, K., Pogliano, J., and Ramamurthi, K.S.** (2011). Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *mBio* **2**.
- Eswaramoorthy, P., Winter, P.W., Wawrzusin, P., York, A.G., Shroff, H., and Ramamurthi, K.S.** (2014). Asymmetric division and differential gene expression during a bacterial developmental program requires DivIVA. *PLoS Genet* **10**, e1004526.
- Eugster, M.R., Haug, M.C., Huwiler, S.G., and Loessner, M.J.** (2011). The cell wall binding domain of *Listeria* bacteriophage endolysin PlyP35 recognizes terminal GlcNAc residues in cell wall teichoic acid. *Mol Microbiol* **81**, 1419-1432.
- Falk, S.P., and Weisblum, B.** (2013). Phosphorylation of the *Streptococcus pneumoniae* cell wall biosynthesis enzyme MurC by a eukaryotic-like ser/thr kinase. *FEMS Microbiol Lett* **340**, 19-23.
- Farber, J.M., and Peterkin, P.I.** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews* **55**, 476-511.
- Felzenszwalb, I., Boiteux, S., and Laval, J.** (1992). Identification of the *radC102* mutation. Order of the genes in the 81.5-82.0 min region of the *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic acids research* **20**, 366.
- Felzenszwalb, I., Sargentini, N.J., and Smith, K.C.** (1984). Characterization of a new radiation-sensitive mutant, *Escherichia coli* K-12 *radC102*. *Radiation research* **97**, 615-625.
- Finley, D.** (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry* **78**, 477-513.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., et al.** (2014). Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet* **10**, e1004275.
- Flynn, J.M., Levchenko, I., Sauer, R.T., and Baker, T.A.** (2004). Modulating substrate choice: The SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes & development* **18**, 2292-2301.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.I., Sauer, R.T., and Baker, T.A.** (2003). Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Molecular cell* **11**, 671-683.
- Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P., and Ingmer, H.** (2007). Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **63**, 1285-1295.
- Freitag, N.E., Port, G.C., and Miner, M.D.** (2009). *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* **7**, 623-628.
- Gaidenko, T.A., Kim, T.J., and Price, C.W.** (2002). The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol* **184**, 6109-6114.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P.** (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**, 1127-1141.
- Gamba, P., Veening, J.W., Saunders, N.J., Hamoen, L.W., and Daniel, R.A.** (2009). Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol* **191**, 4186-4194.
- Garner, E.C., Bernard, R., Wang, W., Zhuang, X., Rudner, D.Z., and Mitchison, T.** (2011). Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science* **333**, 222-225.
- Gee, C.L., Papavinasasundaram, K.G., Blair, S.R., Baer, C.E., Falick, A.M., King, D.S., Griffin, J.E., Venghatakrishnan, H., Zukauskas, A., Wei, J.R., et al.** (2012). A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in mycobacteria. *Sci Signal* **5**, ra7.

- Gerard, P., Vernet, T., and Zapun, A.** (2002). Membrane topology of the *Streptococcus pneumoniae* FtsW division protein. *J Bacteriol* **184**, 1925-1931.
- Gerth, U., Kirstein, J., Mostertz, J., Waldminghaus, T., Miethke, M., Kock, H., and Hecker, M.** (2004). Fine-tuning in regulation of Clp protein content in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **186**(1):179-91.
- Gerth, U., Kock, H., Kusters, I., Michalik, S., Switzer, R.L., and Hecker, M.** (2008). Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**, 321-331.
- Ghuysen, J.M.** (1968). Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriological reviews* **32**, 425-464.
- Giefing, C., Jelencsics, K.E., Gelbmann, D., Senn, B.M., and Nagy, E.** (2010). The pneumococcal eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP co-localizes with the cell division apparatus and interacts with FtsZ *in vitro*. *Microbiology* **156**, 1697-1707.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., et al.** (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**, 849-852.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.M.** (1998). Multimodular penicillin-binding proteins: An enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1079-1093.
- Gordon, E., Mouz, N., Duee, E., and Dideberg, O.** (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: Implication in drug resistance. *J Mol Biol* **299**, 477-485.
- Gordon, R.C., Barrett, F.F., and Clark, D.J.** (1972). Influence of several antibiotics, singly and in combination, on the growth of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of pediatrics* **80**, 667-670.
- Gouin, E., Welch, M.D., and Cossart, P.** (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current opinion in microbiology* **8**, 35-45.
- Gray, M.L., and Killinger, A.H.** (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological reviews* **30**, 309-382.
- Gregory, J.A., Becker, E.C., and Pogliano, K.** (2008). *Bacillus subtilis* MinC destabilizes FtsZ-rings at new cell poles and contributes to the timing of cell division. *Genes & development* **22**, 3475-3488.
- Gueiros-Filho, F.J., and Losick, R.** (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes & development* **16**, 2544-2556.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C.** (2006). Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* egde. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 2824-2828.
- Gunaratnam, G., Tuchscher, L., Elhawy, M.I., Bertram, R., Eisenbeis, J., Spengler, C., Tschernig, T., Löffler, B., Somerville, G.A., Jacobs, K., et al.** (2019). ClpC affects the intracellular survival capacity of *Staphylococcus aureus* in non-professional phagocytic cells. *Sci Rep* **9**, 16267.
- Halbedel, S., Hahn, B., Daniel, R.A., and Flieger, A.** (2012). DivIVA affects secretion of virulence-related autolysins in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **83**, 821-839.
- Halbedel, S., and Lewis, R.J.** (2019). Structural basis for interaction of DivIVA/GpsB proteins with their ligands. *Mol Microbiol* **111**, 1404-1415.
- Hall, C.L., Tschannen, M., Worthey, E.A., and Kristich, C.J.** (2013). IreB, a Ser/Thr kinase substrate, influences antimicrobial resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 6179-6186.
- Hamoen, L.W., Meile, J.C., de Jong, W., Noirot, P., and Errington, J.** (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol Microbiol* **59**, 989-999.
- Hamon, M., Bierre, H., and Cossart, P.** (2006). *Listeria monocytogenes*: A multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* **4**, 423-434.

- Hansen, J.M., Gerner-Smidt, P., and Bruun, B.** (2005). Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. *APMIS* **113**, 31-36.
- Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., Ohlsen, K., Sahl, H.G., Bierbaum, G., Schneider, T., et al.** (2017). The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **307**, 1-10.
- Hartman, B.J., and Tomasz, A.** (1984). Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **158**, 513-516.
- Henriques, A.O., Glaser, P., Piggot, P.J., and Moran, C.P., Jr.** (1998). Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **28**, 235-247.
- Hinnerwisch, J., Fenton, W.A., Furtak, K.J., Farr, G.W., and Horwich, A.L.** (2005). Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation. *Cell* **121**, 1029-1041.
- Hof, H.** (1991). Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis. *Infection* **19 Suppl 4**, S229-233.
- Huang, Y.Y., Sun, Y.H., Huang, N., Liu, X.X., Yan, J., and Sun, A.H.** (2018). Sublethal beta-lactam antibiotics induce PhpP phosphatase expression and StkP kinase phosphorylation in PBP-independent beta-lactam antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemical and biophysical research communications* **503**, 2000-2008.
- Huber, G., and Neesemann, G.** (1968). Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis. *Biochemical and biophysical research communications* **30**, 7-13.
- Hunter, T.** (2012). Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**, 2513-2516.
- Irazoki, O., Hernandez, S.B., and Cava, F.** (2019). Peptidoglycan muropeptides: Release, perception, and functions as signaling molecules. *Front Microbiol* **10**, 500.
- Ito, K., and Akiyama, Y.** (2005). Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annual review of microbiology* **59**, 211-231.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., and Hiramatsu, K.** (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1323-1336.
- Jamshidi, A., and Zeinali, T.** (2019). Significance and characteristics of *Listeria monocytogenes* in poultry products. *International journal of food science* **2019**, 7835253.
- Johnson, L.N., and Lewis, R.J.** (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical reviews* **101**, 2209-2242.
- Jones, G., and Dyson, P.** (2006). Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of gram-positive peptidoglycan: Inside versus outside. *J Bacteriol* **188**, 7470-7476.
- Jones, L.J., Carballido-Lopez, R., and Errington, J.** (2001). Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**, 913-922.
- Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Karlowsky, J.A., Sahm, D.F., and Wenzel, R.P.** (2004). Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit-a european and north american surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **3**, 14.
- Joseph, B., and Goebel, W.** (2007). Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes and infection* **9**, 1188-1195.
- Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J., and Kropp, H.** (1974). The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci* **235**, 364-386.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D.** (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5752-5756.
- Kaval, K.G., and Halbedel, S.** (2012). Architecturally the same, but playing a different game: The diverse species-specific roles of DivIVA proteins. *Virulence* **3**, 406-407.
- Kaval, K.G., Rismondo, J., and Halbedel, S.** (2014). A function of DivIVA in *Listeria monocytogenes* division site selection. *Mol Microbiol* **94**, 637-654.

- Kerscher, O., Felberbaum, R., and Hochstrasser, M.** (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual review of cell and developmental biology* **22**, 159-180.
- Kibbe, W.A.** (2007). Oligocalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research* **35**, W43-46.
- Kieser, K.J., Boutte, C.C., Kester, J.C., Baer, C.E., Barczak, A.K., Meniche, X., Chao, M.C., Rego, E.H., Sassetti, C.M., Fortune, S.M., et al.** (2015). Phosphorylation of the peptidoglycan synthase PonA1 governs the rate of polar elongation in mycobacteria. *PLoS Pathog* **11**, e1005010.
- Kirstein, J., Dougan, D.A., Gerth, U., Hecker, M., and Turgay, K.** (2007). The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *Embo j* **26**, 2061-2070.
- Kirstein, J., Hoffmann, A., Lilie, H., Schmidt, R., Rubsamen-Waigmann, H., Brotz-Oesterhelt, H., Mogk, A., and Turgay, K.** (2009a). The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. *EMBO Mol Med* **1**, 37-49.
- Kirstein, J., Moliere, N., Dougan, D.A., and Turgay, K.** (2009b). Adapting the machine: Adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat Rev Microbiol* **7**, 589-599.
- Kirstein, J., and Turgay, K.** (2005). A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9**, 182-188.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S.D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K.K., Arnaud, M., Asai, K., Ashikaga, S., Aymerich, S., Bessieres, P., et al.** (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4678-4683.
- Kock, H., Gerth, U., and Hecker, M.** (2004). MurAA, catalysing the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is a target of Clp-dependent proteolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **51**, 1087-1102.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P.** (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**, 521-531.
- Kohlrausch, U., and Holtje, J.V.** (1991). Analysis of murein and murein precursors during antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 3425-3431.
- Koo, B.M., Kritikos, G., Farelli, J.D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., Wapinski, I., Galardini, M., Cabal, A., Peters, J.M., et al.** (2017). Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell systems* **4**, 291-305.e297.
- Krawczyk-Balska, A., and Markiewicz, Z.** (2016). The intrinsic cephalosporin resistome of *Listeria monocytogenes* in the context of stress response, gene regulation, pathogenesis and therapeutics. *J Appl Microbiol* **120**, 251-265.
- Kristich, C.J., Little, J.L., Hall, C.L., and Hoff, J.S.** (2011). Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *mBio* **2**, e00199-00111.
- Kristich, C.J., Wells, C.L., and Dunny, G.M.** (2007). A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3508-3513.
- Krüger, E., Völker, U., and Hecker, M.** (1994). Stress induction of ClpC in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J Bacteriol* **176**, 3360-3367.
- Kruse, T., Bork-Jensen, J., and Gerdes, K.** (2005). The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol Microbiol* **55**, 78-89.
- Ladant, D., and Ullmann, A.** (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: A toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* **7**, 172-176.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamont, R.F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J.P., Vaisbuch, E., Kim, S.K., Uldbjerg, N., and Romero, R.** (2011). Listeriosis in human pregnancy: A systematic review. *J Perinat Med* **39**, 227-236.

- Land, A.D., Tsui, H.C., Kocaoglu, O., Vella, S.A., Shaw, S.L., Keen, S.K., Sham, L.T., Carlson, E.E., and Winkler, M.E.** (2013). Requirement of essential PBP2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* **90**, 939-955.
- Leaver, M., and Errington, J.** (2005). Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **57**, 1196-1209.
- Lecuit, M.** (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and infection* **9**, 1216-1225.
- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L.J., Errington, J., Marenduzzo, D., and Hamoen, L.W.** (2009). Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *Embo j* **28**, 2272-2282.
- Lenz, L.L., and Portnoy, D.A.** (2002). Identification of a second *Listeria secA* gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol Microbiol* **45**, 1043-1056.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D.** (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9642-9647.
- Levin, P.A., and Losick, R.** (1994). Characterization of a cell division gene from *Bacillus subtilis* that is required for vegetative and sporulation septum formation. *J Bacteriol* **176**, 1451-1459.
- Levin, P.A., Margolis, P.S., Setlow, P., Losick, R., and Sun, D.** (1992). Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. *J Bacteriol* **174**, 6717-6728.
- Lewis, R.J.** (2017). The GpsB files: The truth is out there. *Mol Microbiol* **103**, 913-918.
- Lima, A., Duran, R., Schujman, G.E., Marchissio, M.J., Portela, M.M., Obal, G., Pritsch, O., de Mendoza, D., and Cervenansky, C.** (2011). Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: Biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *Journal of proteomics* **74**, 1720-1734.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., et al.** (1988). Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. *The New England journal of medicine* **319**, 823-828.
- Liu, H., and Naismith, J.H.** (2008). An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC biotechnology* **8**, 91.
- Lombardo, M.J., and Rosenberg, S.M.** (2000). *radC102* of *Escherichia coli* is an allele of *recG*. *J Bacteriol* **182**, 6287-6291.
- Lopez-Valladares, G., Danielsson-Tham, M.L., and Tham, W.** (2018). Implicated food products for listeriosis and changes in serovars of *Listeria monocytogenes* affecting humans in recent decades. *Foodborne pathogens and disease* **15**, 387-397.
- Lovering, A.L., Safadi, S.S., and Strynadka, N.C.** (2012). Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annual review of biochemistry* **81**, 451-478.
- Löwe, J., and Amos, L.A.** (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**, 203-206.
- Lupas, A., Flanagan, J.M., Tamura, T., and Baumeister, W.** (1997). Self-compartmentalizing proteases. *Trends in biochemical sciences* **22**, 399-404.
- Lysenko, E., Ogura, T., and Cutting, S.M.** (1997). Characterization of the *ftsH* gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143** (Pt 3), 971-978.
- Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J.V., Gnad, F., Kumar, C., Jensen, P.R., and Mann, M.** (2007). The Serine/Threonine/Tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* **6**, 697-707.
- Machata, S., Hain, T., Rohde, M., and Chakraborty, T.** (2005). Simultaneous deficiency of both MurA and p60 proteins generates a rough phenotype in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **187**, 8385-8394.
- Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O., and Dessen, A.** (2006). Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS microbiology reviews* **30**, 673-691.

- Magnuson, R., Solomon, J., and Grossman, A.D.** (1994). Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell* **77**, 207-216.
- Mandel, M., and Higa, A.** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**, 159-162.
- Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C., and Grangeasse, C.** (2016). Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS microbiology reviews* **40**, 41-56.
- Marquardt, J.L., Brown, E.D., Lane, W.S., Haley, T.M., Ichikawa, Y., Wong, C.H., and Walsh, C.T.** (1994). Kinetics, stoichiometry, and identification of the reactive thiolate in the inactivation of UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry* **33**, 10646-10651.
- Marston, A.L., and Errington, J.** (1999). Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol Microbiol* **33**, 84-96.
- Marston, A.L., Thomaides, H.B., Edwards, D.H., Sharpe, M.E., and Errington, J.** (1998). Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes & development* **12**, 3419-3430.
- Martin, A., Baker, T.A., and Sauer, R.T.** (2005). Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines. *Nature* **437**, 1115-1120.
- Martin, A., Baker, T.A., and Sauer, R.T.** (2008). Pore loops of the AAA+ ClpX machine grip substrates to drive translocation and unfolding. *Nature structural & molecular biology* **15**, 1147-1151.
- Massidda, O., Anderluzzi, D., Friedli, L., and Feger, G.** (1998). Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **144** (Pt 11), 3069-3078.
- Masson, S., Kern, T., Le Gouellec, A., Giustini, C., Simorre, J.P., Callow, P., Vernet, T., Gabel, F., and Zapun, A.** (2009). Central domain of DivIB caps the C-terminal regions of the FtsL/DivIC coiled-coil rod. *J Biol Chem* **284**, 27687-27700.
- McCallum, N., Meier, P.S., Heusser, R., and Berger-Bachi, B.** (2011). Mutational analyses of open reading frames within the *vraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1391-1402.
- Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z.** (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* **537**, 634-638.
- Meeske, A.J., Sham, L.T., Kimsey, H., Koo, B.M., Gross, C.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z.** (2015). MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 6437-6442.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., and Cossart, P.** (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**, 923-932.
- Mercier, R., Kawai, Y., and Errington, J.** (2013). Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. *Cell* **152**, 997-1007.
- Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G.J., and Husson, R.N.** (2011). The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. *PLoS Pathog* **7**, e1002182.
- Misra, S.K., Milohanic, E., Aké, F., Mijakovic, I., Deutscher, J., Monnet, V., and Henry, C.** (2011). Analysis of the serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* reveals phosphorylated proteins related to virulence. *Proteomics* **11**, 4155-4165.
- Mohammadi, T., Karczmarek, A., Crouvoisier, M., Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., and den Blaauwen, T.** (2007). The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a

complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **65**, 1106-1121.

Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Disteche, M., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *Embo j* **30**, 1425-1432.

Moliere, N., and Turgay, K. (2009). Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* **160**, 637-644.

Molle, V., and Kremer, L. (2010). Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol Microbiol* **75**, 1064-1077.

Monk, I.R., Gahan, C.G., and Hill, C. (2008). Tools for functional postgenomic analysis of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3921-3934.

Mukherjee, A., and Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol* **176**, 2754-2758.

Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* **67**(5):995-1006.

Murray, T., Popham, D.L., and Setlow, P. (1996). Identification and characterization of *pbpC*, the gene encoding *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 3. *Journal of Bacteriology* **178**, 6001-6005.

Nanninga, N. (1991). Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 791-795.

Navarre, W.W., and Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 174-229.

Neher, S.B., Flynn, J.M., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2003). Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes & development* **17**, 1084-1089.

Novakova, L., Saskova, L., Pallova, P., Janecek, J., Novotna, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.C., and Branny, P. (2005). Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *The FEBS journal* **272**, 1243-1254.

Oliva, M.A., Halbedel, S., Freund, S.M., Dutow, P., Leonard, T.A., Veprintsev, D.B., Hamoen, L.W., and Lowe, J. (2010). Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. *EMBO J* **29**, 1988-2001.

Orsi, R.H., and Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria spp.*, including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied microbiology and biotechnology* **100**, 5273-5287.

Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* **28**, 81-93.

Parikh, A., Verma, S.K., Khan, S., Prakash, B., and Nandicoori, V.K. (2009). PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, *N*-acetylglucosamine-1-phosphate uridylyltransferase, modulates its acetyltransferase activity. *J Mol Biol* **386**, 451-464.

Patrick, J.E., and Kearns, D.B. (2008). MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **70**, 1166-1179.

Peel, M., Donachie, W., and Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of general microbiology* **134**, 2171-2178.

Pensinger, D.A., Aliota, M.T., Schaenzer, A.J., Boldon, K.M., Ansari, I.U., Vincent, W.J., Knight, B., Reniere, M.L., Striker, R., and Sauer, J.D. (2014). Selective pharmacologic inhibition of a PASTA kinase increases *Listeria monocytogenes* susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 4486-4494.

- Pensinger, D.A., Boldon, K.M., Chen, G.Y., Vincent, W.J., Sherman, K., Xiong, M., Schaezner, A.J., Forster, E.R., Coers, J., Striker, R., et al.** (2016). The *Listeria monocytogenes* PASTA kinase PrkA and its substrate YvcK are required for cell wall homeostasis, metabolism, and virulence. *PLoS Pathog* **12**, e1006001.
- Pichoff, S., and Lutkenhaus, J.** (2005). Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol Microbiol* **55**, 1722-1734.
- Piepenbreier, H., Diehl, A., and Fritz, G.** (2019). Minimal exposure of lipid II cycle intermediates triggers cell wall antibiotic resistance. *Nat Commun* **10**, 2733.
- Pinho, M.G., Kjos, M., and Veening, J.W.** (2013). How to get (a)round: Mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol* **11**, 601-614.
- Pizarro-Cerda, J., Charbit, A., Enninga, J., Lafont, F., and Cossart, P.** (2016). Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Seminars in cell & developmental biology* **60**, 155-167.
- Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A., and Cossart, P.** (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: An updated view. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
- Pompeo, F., Foulquier, E., Serrano, B., Grangeasse, C., and Galinier, A.** (2015). Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **97**, 139-150.
- Prepiak, P., and Dubnau, D.** (2007). A peptide signal for adapter protein-mediated degradation by the AAA+ protease ClpCP. *Molecular cell* **26**, 639-647.
- Prisic, S., Dankwa, S., Schwartz, D., Chou, M.F., Locasale, J.W., Kang, C.M., Bemis, G., Church, G.M., Steen, H., and Husson, R.N.** (2010). Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7521-7526.
- Promadej, N., Fiedler, F., Cossart, P., Dramsi, S., and Kathariou, S.** (1999). Cell wall teichoic acid glycosylation in *Listeria monocytogenes* serotype 4b requires *gtcA*, a novel, serogroup-specific gene. *J Bacteriol* **181**, 418-425.
- Radoshevich, L., and Cossart, P.** (2018). *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* **16**, 32-46.
- Rakette, S., Donat, S., Ohlsen, K., and Stehle, T.** (2012). Structural analysis of *Staphylococcus aureus* serine/threonine kinase PknB. *PloS one* **7**, e39136.
- Ramamurthi, K.S., and Losick, R.** (2009). Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13541-13545.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P., and Vijila, H.M.** (2007). *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of microbiology, immunology, and infection* **40**, 4-13.
- Ravid, T., and Hochstrasser, M.** (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 679-690.
- Ravikumar, V., Shi, L., Krug, K., Derouiche, A., Jers, C., Cousin, C., Kobir, A., Mijakovic, I., and Macek, B.** (2014). Quantitative phosphoproteome analysis of *Bacillus subtilis* reveals novel substrates of the kinase PrkC and phosphatase PrpC. *Mol Cell Proteomics* **13**, 1965-1978.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J.** (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in enzymology* **248**, 183-228.
- RayChaudhuri, D., and Park, J.T.** (1992). *Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein. *Nature* **359**, 251-254.
- Reid, B.G., Fenton, W.A., Horwich, A.L., and Weber-Ban, E.U.** (2001). ClpA mediates directional translocation of substrate proteins into the ClpP protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3768-3772.
- Rismondo, J., Bender, J.K., and Halbedel, S.** (2017). Suppressor mutations linking GpsB with the first committed step of peptidoglycan biosynthesis in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **199**.

- Rismondo, J., Cleverley, R.M., Lane, H.V., Grosshennig, S., Steglich, A., Möller, L., Mannala, G.K., Hain, T., Lewis, R.J., and Halbedel, S.** (2016). Structure of the bacterial cell division determinant GpsB and its interaction with penicillin-binding proteins. *Mol Microbiol* **99**, 978-998.
- Rismondo, J., Halbedel, S., and Gründling, A.** (2019). Cell shape and antibiotic resistance are maintained by the activity of multiple FtsW and RodA enzymes in *Listeria monocytogenes*. *mBio* **10**.
- Rismondo, J., Möller, L., Aldridge, C., Gray, J., Vollmer, W., and Halbedel, S.** (2015). Discrete and overlapping functions of peptidoglycan synthases in growth, cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **95**, 332-351.
- Rismondo, J., Percy, M.G., and Gründling, A.** (2018). Discovery of genes required for lipoteichoic acid glycosylation predicts two distinct mechanisms for wall teichoic acid glycosylation. *J Biol Chem* **293**, 3293-3306.
- Rismondo, J.** (2016). Einfluss des GpsB-Proteins auf die Zellwandsynthese, die Zellteilung und die Virulenz von *Listeria monocytogenes*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Rosemeyer, L. R.** (2018). Visualization of *Listeria monocytogenes* cell division using fluorescent reporter strains. Masterarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Robert Koch-Institut.** (2019). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018. ISBN: 978-3-89606-297-0. DOI: 10.25646/5978
- Robert Koch-Institut.** (2015). Listeriose. RKI-Ratgeber. URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Listeriose.html#doc2396598bodyText25 (06.05.2020)
- Rouquette, C., Ripio, M.T., Pellegrini, E., Bolla, J.M., Tascon, R.I., Vazquez-Boland, J.A., and Berche, P.** (1996). Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **21**, 977-987.
- Rued, B.E., Zheng, J.J., Mura, A., Tsui, H.T., Boersma, M.J., Mazny, J.L., Corona, F., Perez, A.J., Fadda, D., Doubravova, L., et al.** (2017). Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of Δ *gpsB* mutations indicate that *GpsB* mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* **103**, 931-957.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sass, P., Josten, M., Famulla, K., Schiffer, G., Sahl, H.G., Hamoen, L., and Brotz-Oesterhelt, H.** (2011). Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17474-17479.
- Sassine, J., Xu, M., Sidiq, K.R., Emmins, R., Errington, J., Daniel, R.A.** (2017) Functional redundancy of division specific penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **106**(2):304-318.
- Sauer, R.T., Bolon, D.N., Burton, B.M., Burton, R.E., Flynn, J.M., Grant, R.A., Hersch, G.L., Joshi, S.A., Kenniston, J.A., Levchenko, I., et al.** (2004). Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell* **119**, 9-18.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P.** (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS microbiology reviews* **32**, 234-258.
- Scheffers, D.J., and Pinho, M.G.** (2005). Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 585-607.
- Schlech, W.F., 3rd, Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., et al.** (1983). Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *The New England journal of medicine* **308**, 203-206.

- Schleifer, K.H., and Kandler, O.** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* **36**, 407-477.
- Schlieker, C., Weibezahn, J., Patzelt, H., Tessarz, P., Strub, C., Zeth, K., Erbse, A., Schneider-Mergener, J., Chin, J.W., Schultz, P.G., et al.** (2004). Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nature structural & molecular biology* **11**, 607-615.
- Schlothauer, T., Mogk, A., Dougan, D.A., Bukau, B., and Turgay, K.** (2003). MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2306-2311.
- Schmidt, A., Trentini, D.B., Spiess, S., Fuhrmann, J., Ammerer, G., Mechtler, K., and Clausen, T.** (2014). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of protein arginine phosphorylation in the bacterial stress response. *Mol Cell Proteomics* **13**, 537-550.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., and Broome, C.V.** (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **4**, 169-183.
- Shah, I.M., Laaberki, M.H., Popham, D.L., and Dworkin, J.** (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* **135**, 486-496.
- Sham, L.T., Butler, E.K., Lebar, M.D., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Ruiz, N.** (2014). Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* **345**, 220-222.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K.** (2000). InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**, 501-510.
- Sieger, B., Schubert, K., Donovan, C., and Bramkamp, M.** (2013). The lipid II flippase RodA determines morphology and growth in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **90**, 966-982.
- Siewert, G., and Strominger, J.L.** (1967). Bacitracin: An inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in the biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**, 767-773.
- Skarzynski, T., Mistry, A., Wonacott, A., Hutchinson, S.E., Kelly, V.A., and Duncan, K.** (1996). Structure of UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-*N*-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure (London, England : 1993)* **4**, 1465-1474.
- Smith, C.A.** (2006). Structure, function and dynamics in the Mur family of bacterial cell wall ligases. *J Mol Biol* **362**, 640-655.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., and Goldfine, H.** (1995). The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **63**, 4231-4237.
- Srinivasan, V., Nam, H.M., Nguyen, L.T., Tamilselvam, B., Murinda, S.E., and Oliver, S.P.** (2005). Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne pathogens and disease* **2**, 201-211.
- Swaminathan, B., and Gerner-Smidt, P.** (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and infection* **9**, 1236-1243.
- Taguchi, A., Welsh, M.A., Marmont, L.S., Lee, W., Sjodt, M., Kruse, A.C., Kahne, D., Bernhardt, T.G., Walker, S.** (2019). FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein. *Nat Microbiol* **4**, 587-594.
- Tavares, J.R., de Souza, R.F., Meira, G.L., and Gueiros-Filho, F.J.** (2008). Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol* **190**, 7096-7107.
- Temple, M.E., and Nahata, M.C.** (2000). Treatment of listeriosis. *The Annals of pharmacotherapy* **34**, 656-661.
- Thevenot, D., Dernburg, A., and Vernozy-Rozand, C.** (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J Appl Microbiol* **101**, 7-17.

- Thomaides, H.B., Freeman, M., El Karoui, M., and Errington, J.** (2001). Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes & development* **15**, 1662-1673.
- Tipper, D.J., and Strominger, J.L.** (1965). Mechanism of action of penicillins: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**, 1133-1141.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., et al.** (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* **459**, 950-956.
- Travier, L., and Lecuit, M.** (2014). *Listeria monocytogenes* ActA: A new function for a 'classic' virulence factor. *Current opinion in microbiology* **17**, 53-60.
- Trentini, D.B., Suskiewicz, M.J., Heuck, A., Kurzbauer, R., Deszcz, L., Mechtler, K., and Clausen, T.** (2016). Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a Clp protease. *Nature* **539**, 48-53.
- Troxler, R., von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B., and Stock, I.** (2000). Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **6**, 525-535.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J., and Dubnau, D.** (1998). Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *Embo j* **17**, 6730-6738.
- Turgay, K., Hamoen, L.W., Venema, G., and Dubnau, D.** (1997). Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes & development* **11**, 119-128.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W.** (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* **10**, 123-136.
- Ulrych, A., Holeckova, N., Goldova, J., Doubravova, L., Benada, O., Kofronova, O., Halada, P., and Branny, P.** (2016). Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase *phpP* mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. *BMC microbiology* **16**, 247.
- van Baarle, S., and Bramkamp, M.** (2010). The MinCDJ system in *Bacillus subtilis* prevents minicell formation by promoting divisome disassembly. *PloS one* **5**, e9850.
- Van de Velde, S., Carryn, S., Van Bambeke, F., Hill, C., Tulkens, P.M., and Sleator, R.D.** (2009). Penicillin-binding proteins (PBP) and Lmo0441 (a PBP-like protein) play a role in beta-lactam sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *Gut Pathog* **1**, 23.
- van Heijenoort, J.** (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* **11**, 25r-36r.
- Van Heijenoort, Y., Derrien, M., and Van Heijenoort, J.** (1978). Polymerization by transglycosylation in the biosynthesis of the peptidoglycan of *Escherichia coli* K 12 and its inhibition by antibiotics. *FEBS letters* **89**, 141-144.
- van Heijenoort, Y., and van Heijenoort, J.** (1980). Biosynthesis of the peptidoglycan of *Escherichia coli* K-12: Properties of the *in vitro* polymerization by transglycosylation. *FEBS letters* **110**, 241-244.
- van Teeffelen, S., and Gitai, Z.** (2011). Rotate into shape: MreB and bacterial morphogenesis. *Embo j* **30**, 4856-4857.
- Varley, A.W., and Stewart, G.C.** (1992). The *divIVB* region of the *Bacillus subtilis* chromosome encodes homologs of *Escherichia coli* septum placement (*minCD*) and cell shape (*mreBCD*) determinants. *J Bacteriol* **174**, 6729-6742.
- Varshavsky, A.** (1991). Naming a targeting signal. *Cell* **64**, 13-15.
- Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., and Cossart, P.** (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* **60**, 219-230.

- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J.** (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-615.
- Vesic, D., and Kristich, C.J.** (2012). MurAA is required for intrinsic cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 2443-2451.
- Vicente, M.F., Perez-Daz, J.C., Baquero, F., Angel de Pedro, M., and Berenguer, J.** (1990). Penicillin-binding protein 3 of *Listeria monocytogenes* as the primary lethal target for beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 539-542.
- Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A.** (2008a). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews* **32**, 149-167.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S.** (2008b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS microbiology reviews* **32**, 259-286.
- Wachi, M., Doi, M., Tamaki, S., Park, W., Nakajima-Iijima, S., and Matsushashi, M.** (1987). Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**, 4935-4940.
- Wamp, S., Rutter, Z.J., Rismondo, J., Jennings, C.E., Möller, L., Lewis, R.J., and Halbedel, S.** (2020). PrkA controls peptidoglycan biosynthesis through the essential phosphorylation of ReoM. *eLife* **9**.
- Wang, F., Mei, Z., Qi, Y., Yan, C., Hu, Q., Wang, J., and Shi, Y.** (2011). Structure and mechanism of the hexameric MecA-ClpC molecular machine. *Nature* **471**, 331-335.
- Watkins, J., and Sleath, K.P.** (1981). Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J Appl Bacteriol* **50**, 1-9.
- Weart, R.B., Nakano, S., Lane, B.E., Zuber, P., and Levin, P.A.** (2005). The ClpX chaperone modulates assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Mol Microbiol* **57**, 238-249.
- Weber-Ban, E.U., Reid, B.G., Miranker, A.D., and Horwich, A.L.** (1999). Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature* **401**, 90-93.
- Weis, J., and Seeliger, H.P.** (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol* **30**, 29-32.
- Welshimer, H.J., and Donker-Voet, J.** (1971). *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol* **21**, 516-519.
- White, C.L., Kitich, A., and Gober, J.W.** (2010). Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol Microbiol* **76**, 616-633.
- Wickner, S., Maurizi, M.R., and Gottesman, S.** (1999). Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
- Yanouri, A., Daniel, R.A., Errington, J., and Buchanan, C.E.** (1993). Cloning and sequencing of the cell division gene *pbpB*, which encodes penicillin-binding protein 2b in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **175**, 7604-7616.
- Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A.** (2002). The pasta domain: A beta-lactam-binding domain. *Trends in biochemical sciences* **27**, 438.
- Zorzi, W., Zhou, X.Y., Dardenne, O., Lamotte, J., Raze, D., Pierre, J., Gutmann, L., and Coyette, J.** (1996). Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol* **178**, 4948-4957.

6. Anhang

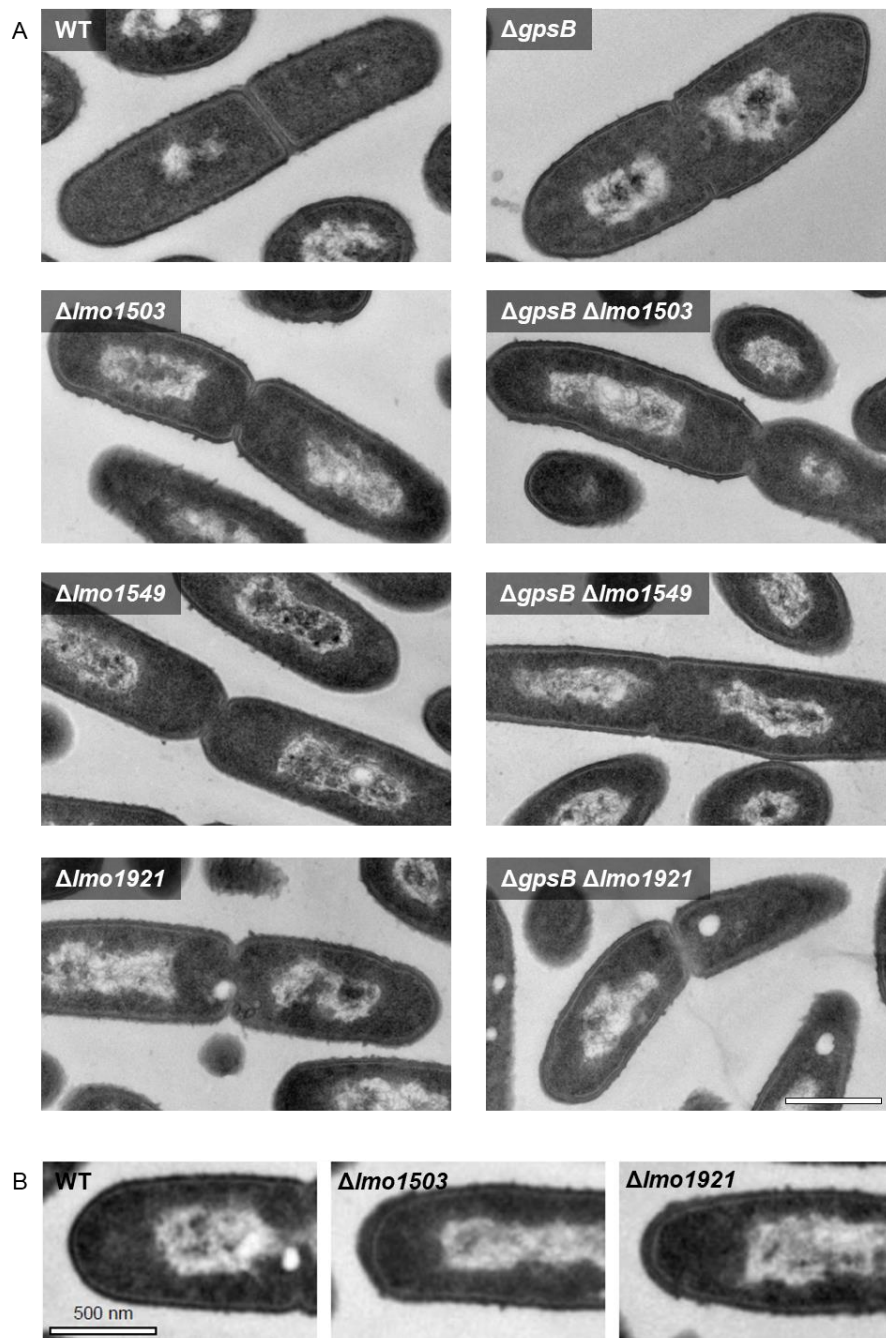


Abbildung A1: Einfluss der Deletionen von *lmo1503*, *lmo1549* und *lmo1921* auf die Zellwanddicke und die Ausbildung der Septen. (A) Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMSW30 ($\Delta lmo1503$), LMJR137 ($\Delta gpsB \Delta lmo1503$), LMSW18 ($\Delta lmo1549$), LMJR119 ($\Delta gpsB \Delta lmo1549$), LMSW32 ($\Delta lmo1921$) und LMJR120 ($\Delta gpsB \Delta lmo1921$) zur Visualisierung der Morphologie der Septen und der Zellwandoberfläche. Maßstab: 500 nm. (B) TEM-Aufnahmen der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMSW30 ($\Delta lmo1503$) und LMSW32 ($\Delta lmo1921$) zeigen die Verdickung der Zellwand an den Zellpolen in der $\Delta lmo1503$ - und der $\Delta lmo1921$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Maßstab: 500 nm.

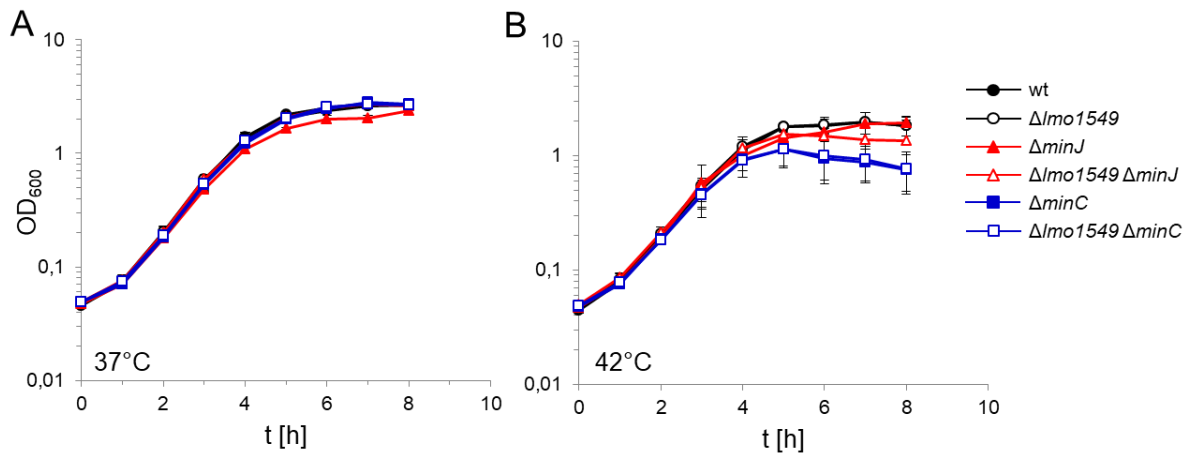


Abbildung A2: Effekt der Deletionen von *minJ* und *minC* auf das Wachstum der $\Delta lmo1549$ -Deletionsmutante. Wachstum der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta lmo1549$), LMS120 ($\Delta minJ$), LMSW69 ($\Delta lmo1549 \Delta minJ$), LMS148 ($\Delta minC$) und LMSW68 ($\Delta lmo1549 \Delta minC$) bei 37°C (A) und 42°C (B). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Replikaten.

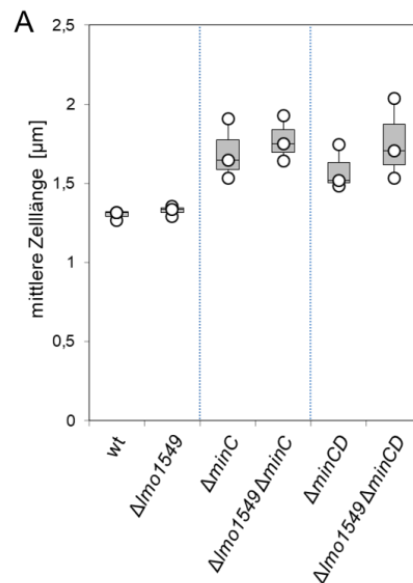


Abbildung A3: Einfluss der Deletionen von *minC* und *minCD* im $\Delta lmo1549$ -Hintergrund auf die Zelllänge. (A) Zelllängenmessung der *L. monocytogenes* Stämme EGD-e (WT), LMSW18 ($\Delta lmo1549$), LMS148 ($\Delta minC$), LMSW68 ($\Delta lmo1549 \Delta minC$), LMKK35 ($\Delta minCD$), LMSW65 ($\Delta lmo1549 \Delta minCD$). Die Stämme wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in BHI bei 37°C angezogen und die Zellmembran anschließend mit Nilrot gefärbt. Pro Stamm wurden innerhalb eines Replikats 300 Zellen vermessen und die Mediane aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und den erfolgreichen Abschluss ermöglicht haben.

Der größte Dank gilt dabei meinem Betreuer und Zweitgutachter PD Dr. Sven Halbedel für die großartige Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit. Ich danke Dir für Dein großes Engagement und die zahlreichen Ideen, ohne die das Projekt so nie möglich gewesen wäre. Vielen Dank, dass ich mit Problemen oder Rückfragen jederzeit zu Dir kommen konnte und Du mir die Teilnahme an so vielen Konferenzen ermöglicht hast.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Susanne Engelmann für die Übernahme des Erstgutachtens und die akademische Betreuung meiner Arbeit bedanken. Ebenso danke ich Prof. Dr. Michael Hust für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich Prof. Dr. Antje Flieger aussprechen, für die Möglichkeit meine Arbeit im Fachgebiet 11 des Robert Koch-Instituts anfertigen zu können und für die Übernahme der Betreuung innerhalb des Robert Koch-Graduiertenkollegs.

Weiterhin möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Zoe Rutter und Prof. Dr. Richard Lewis von der Newcastle University für die Aufklärung der Kristallstruktur von ReoM bedanken. Lars Möller und Gudrun Holland danke ich für die Anfertigung der REM- und TEM-Aufnahmen. Bei Dr. Jeanine Rismondo bedanke ich mich für die Durchführung der WTA-Färbung, für die zahlreichen hinterlassenen Plasmide, Stämme und anderen Vorarbeiten, die ich für meine Arbeit weiter nutzen konnte, und ihre Bereitschaft mich bei Problemen stets zu unterstützen.

Ein großes Dankeschön geht an Simone Dumschat und Birgitt Hahn für die Unterstützung bei verschiedenen Experimenten und die Hilfe bei allen organisatorischen Belangen im Laboralltag. Dr. Martin Fischer und Dr. Samuel Hauf danke ich für ihre Motivation und ihren Humor, mit dem sie mich trotz manchmal frustrierender Ergebnisse immer wieder zum Lachen bringen konnten. Samuel danke ich weiterhin für die vielen Ideen zur Optimierung der Protokolle, die einem so manchen Arbeitsschritt erleichtert haben und dafür, dass er mir seit dem ersten Tag mit Rat und Tat zur Seite stand. Weiterhin möchte ich mich bei Lisa Rosemeyer und Janina Döhling bedanken, die im Rahmen ihrer Masterarbeiten einen wertvollen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben. Allen Mitgliedern der AG *Listeria* danke ich für das familiäre Miteinander, die Hilfsbereitschaft und die gegenseitige Unterstützung.

Weiterhin möchte ich allen anderen Mitarbeitern des Fachgebiets 11 danken sowie allen aktuellen und ehemaligen Doktoranden, insbesondere Dr. Miriam Hiller, Dr. Wiebke Michel, Dr. Christina Lang, Kristin Weber und Ulrike Blaschke. Vielen Dank für eure Hilfsbereitschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen schönen Momente auch außerhalb des Labors.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Freunde, meinen Freund und meine großartige Familie für ihr Verständnis, die Rückenstärkung und stetige Unterstützung auf diesem Weg.

Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann und ihr so sehr an mich glaubt!!